



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Determinación del efecto de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. sobre las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Ricardo Jhoel BRICEÑO LEÓN

José Feliciano CHÁVEZ MONTERROSO

ASESOR

Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Briceño R., Chávez J. Determinación del efecto de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. sobre las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Determinación del efecto de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. sobre las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*"

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**JOSÉ FELICIANO CHÁVEZ MONTERROSO Y
RICARDO JHOEL BRICEÑO LEÓN**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

APROBADO SOBRESALIENTE (17)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 24 de octubre de 2018.

Dr. Víctor Crispín Pérez
Presidente

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Miembro

Mg. Francisco Javier María Ramírez Cruz
Miembro

Mg. Oscar Herrera Calderón
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima I – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima I
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



DEDICATORIA

Dedicado a mi madre ***Nelida Margarita León Oscanoa***, mi padre ***Glicerio Briceño Rivera***, mi hermanita ***Crystell Hideki Briceño León***, mis abuelos ***Catalina Oscanoa*** y ***Gelacio León***, a mis primos y tíos; una gran familia que me impulsa y reta día a día a exigirme y sobrepasar mis límites, a ellos mil gracias.

Una dedicación especial a mis mentores ***Walter Bazán, Arturo Espinoza*** y ***Lily Javier***.

Ricardo Jhoel Briceño León

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la vida y estar siempre en mi camino.

A mi esposa Gimena y a mi hija Fernanda Isabel, quienes son el amor y alegría de mi vida.

A mi padre Felix, por enseñarme con el ejemplo su responsabilidad y constancia en el trabajo y por todo el amor infinito que dedica a sus hijos.

A mi madre Asencia, por todo su amor incondicional, por todos los cuidados que me brindó desde pequeño y por cultivar en mí los valores y principios que hoy rigen mi vida.

A mis hermanos Roxana, Daniel, Jesús y Guillermo, por su cariño y por comprender mis ausencias en algunos momentos.

A mi madrina Estela, por el gran apoyo que me brindó desde niño y por enseñarme el amor a Dios.

A mis profesores Rosalí, Gambini y Huamash, por todo su apoyo.

José Feliciano Chávez Monterroso

AGRADECIMIENTOS

Al **Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz**, quien contagia su vocación por la enseñanza y el autoaprendizaje, por su gran apoyo en todas las etapas de la tesis y por motivarnos en los momentos más arduos de la investigación.

A los respetados Miembros del Jurado Calificador: **Dr. Victor Crispín Pérez, Dra. María Elena Salazar Salvatierra, Mg. Francisco Javier María Ramírez Cruz y Mg. Oscar Herrera Calderón**; por sus valiosas recomendaciones para mejorar la presente tesis y por todo el tiempo brindado.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Objetivo general	13
1.2. Objetivos específicos	13
II. GENERALIDADES	14
2.1. Especies	14
2.1.1. <i>Hyptis eriocephala</i> Benth.	14
2.1.2. <i>Piper umbellatum</i> L.	16
2.2. Biopelículas bacterianas	21
2.2.1. Definición de biopelículas	22
2.2.2. Estructura de las biopelículas	23
2.2.3. Etapas de la formación de biopelículas	24
2.2.5. Biopelículas como problema de salud pública	31
2.2.6. Estafilococos formadores de biopelículas con importancia clínica	33
2.2.7. Técnicas para la detección de cepas formadoras de biopelículas	33
III. PARTE EXPERIMENTAL	38
3.5. Método	39
3.5.1. Flujograma de la parte experimental	39
3.5.2. Recolección de las especies vegetales	40
3.5.3. Identificación taxonómica de las especies	41
3.5.4. Acondicionado y secado de las especies vegetales	41
3.5.5. Preparación de los extractos	42
3.5.6. Ensayos Fitoquímicos	43
3.5.7. Ensayo microbiológico	46
IV. RESULTADOS	54

4.1. Ensayos Fitoquímicos.....	54
4.1.1. Resultados de la Marcha Fitoquímica preliminar.....	54
4.1.2. Análisis de Cromatografía en capa fina.....	56
4.2. Actividad antibacteriana.....	57
4.2.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	57
4.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB)	61
V. DISCUSIÓN.....	65
VI. CONCLUSIONES.....	70
VII. RECOMENDACIONES.....	71
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
IX. ANEXOS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Hyptis eriocephala* Benth.

Figura 2. *Piper umbellatum* L.

Figura 3. Factores genéticos y ambientales para la formación de biopelículas.
Modificado de Marić S, y col.

Figura 4. Representación esquemática de la formación de biopelículas.
Adaptado de Philips P, y col

Figura 5. Estructura química de la Resazurina reducida a Resofurina en células viables.

Figura 6. Cepas bacterianas ATCC.

Figura 7. Mapa de la provincia de Luya – Región Amazonas.

Figura 8. Extractos en proceso de concentración.

Figura 9. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus*.

Figura 10. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus epidermidis*

Figura 11. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus aureus*.

Figura 12. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas seleccionadas por su potencial actividad antibacteriana.

Tabla 2. Preparación de extractos etanólicos y metanólicos.

Tabla 3. Pesos de los extractos concentrados.

Tabla 4. Volumen de extractos filtrados para los Ensayos Fitoquímicos.

Tabla 5. Interpretación de resultados de la Marcha Fitoquímica.

Tabla 6. Diseño de la microplaca de poliestireno empleado en el estudio.

Tabla 7. Clasificación de la actividad antibacteriana según valores de concentración mínima inhibitoria.

Tabla 8. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth.

Tabla 9. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los extractos de *Piper umbellatum* L.

Tabla 10. Cromatografía en capa fina de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. (Rf de los metabolitos secundarios)

Tabla 11. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 12. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 13. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 14. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*.

ABREVIATURAS

ARC: Agar Rojo de Congo.

CFB: Cepas Formadoras de Biopelículas.

QS: Quorum-Sensing.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CMIB: Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas.

EPS: Exopolisacáridos.

MSCRAMM: Por sus siglas del inglés “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules” (Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ECoN: Estafilococos coagulasa negativo.

CV: Cristal Violeta.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

DMSO: Dimetilsulfóxido

TSA: Agar Triptona Soya.

Caldo MH: Caldo Mueller-Hinton

RZ: Resazurina.

RESUMEN

Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos y metanólicos de hojas y tallos de *Hyptis eriocephala* Benth y de hojas de *Piper umbellatum* L. recolectadas en el Departamento de Amazonas (Perú), frente a cepas planctónicas y biopelículas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) se empleó el método de microdilución en placa de 96 pocillos de poliestireno con resazurina. Para el caso de las biopelículas primero se seleccionaron a las Cepas Formadoras de Biopelículas (CFB) mediante el método de Agar Rojo de Congo (ARC). Conclusiones; Todos los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. demostraron actividad antibacteriana frente a las cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; La actividad antibacteriana moderada fue evidenciada frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 para el extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth con un valor de CMI de 250 µg/mL y para los extractos de *Piper umbellatum* L con valores de CMI de 250 µg/mL y 125 µg/mL. Sólo el extracto etanólico de *Piper umbellatum* L. presentó actividad antibiopelícula débil frente a biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con un valor de CMIB de 1000 µg/mL, mientras que los demás extractos no presentaron actividad antibiopelícula frente a los microorganismos estudiados.

Palabras clave: *Hyptis eriocephala* Benth, *Piper umbellatum* L., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, biopelículas, microdilución en placa con resazurina.

SUMMARY

The *in vitro* antibacterial activity of the ethanolic and methanolic extracts of the leaves and stems of *Hyptis eriocephala* Benth and the leaves of *Piper umbellatum* L. collected in the Department of Amazonas (Peru), was determined against planktonic strains and biofilms of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Inhibitory Concentration of Biofilms (CMIB), the microdilution method was used in the polystyrene 96-well plate with resazurin. In the case of biofilms, it was selected in the Biofilm Forming Strains (CFB) by the Congo Red Agar (ARC) method. Conclusions; All extracts of *Hyptis eriocephala* Benth and *Piper umbellatum* L. demonstrated antibacterial activity against the planktonic strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; The moderate antibacterial activity was demonstrated against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 for the ethanolic extract of the stems of *Hyptis eriocephala* Benth with a MIC value of 250 µg/mL and for the results of *Piper umbellatum* L with MIC values of 250 µg/mL and 125 µg/mL. Only the ethanolic extract of *Piper umbellatum* L. showed weak antibiofilm activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 with a CMIB value of 1000 µg/mL, while the other extracts did not show antibiofilm activity against the microorganisms studied.

Key words: *Hyptis eriocephala* Benth, *Piper umbellatum* L., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, biofilms, microdilution in plate with resazurin.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años en el Perú se ha incrementado el interés por la investigación de aquella forma de vida en comunidad que adoptan las bacterias cuando se encuentran en condiciones hostiles, denominadas biopelículas, puesto que son la causa de problemas relacionados a la práctica médica antiinfecciosa ¹.

Enfermedades infecciosas como la otitis media, endocarditis de las válvulas nativas, infecciones urinarias crónicas, prostatitis bacteriana, neumonías crónicas, osteomielitis, infecciones implicadas en la fibrosis quística e infecciones relacionadas con dispositivos médicos, son producidas por bacterias patógenas con esta forma de vida, lo que representa un problema crítico en salud ^{1, 2, 3}.

Las biopelículas son comunidades bacterianas que pueden crecer sobre tejidos vivos o superficies inertes, lo que explica su exitosa forma de colonización y supervivencia, incluso reportadas en registros fósiles, con ventajas ante fluctuaciones del ambiente como la humedad, temperatura, pH, concentración de nutrientes y eliminación de desechos ⁴.

Algunas bacterias están descritas con mayor frecuencia en la literatura por formar biopelículas sobre dispositivos médicos, como es el caso de *Staphylococcus epidermidis* el cual se caracteriza por tener condiciones específicas en su señalización intercelular “*Quorum-Sensing*” (QS) (sistema de comunicación para regular la densidad de población de las biopelículas) que le permiten formar biopelículas exitosamente sobre dispositivos médicos ⁵.

La importancia de estudiar a las biopelículas radica en que la expresión de sus mecanismos de supervivencia es responsable de problemas en la práctica médica tales como la resistencia a los antibióticos, infecciones recurrentes e intrahospitalarias por contaminación de dispositivos médicos, así como la dificultad en la cicatrización de heridas ¹.

Las biopelículas también pueden ser contaminantes patógenos en la industria de los alimentos y es un desafío utilizar nuevos métodos de limpieza y desinfección porque desinfectantes como el cloro no son efectivos, por lo que se hace necesaria la utilización de desinfectantes tales como: amonios cuaternarios, ácido peracético y peróxido de hidrógeno, por ser efectivos para este fin, pero cuentan con inconvenientes en su manipulación ^{6,7,8}.

En el Perú es ampliamente conocido el uso tradicional de plantas medicinales, la misma que se hereda del conocimiento empírico a través del tiempo, es así que es un país considerado entre los más megadiversos del mundo, y alberga una serie de especies vegetales que en la actualidad vienen siendo mostradas con gran potencial como fuente de moléculas bioactivas con posible aplicación terapéutica y entre ellas las aplicaciones sobre la actividad antibiopelícula mediante ensayos por microdilución en placa ⁹.

La bibliografía sugiere reconocer que las estrategias con las que se combaten a las formas planctónicas son ineficaces cuando se enfrentan a las bacterias formadoras de biopelículas ^{6, 10-12}.

1.1. Objetivo general

- Determinar el efecto de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. sobre las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de hojas y tallos de *Hyptis eriocephala* Benth y de hojas de *Piper umbellatum* L. frente a las cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de hojas y tallos de *Hyptis eriocephala* Benth y de hojas de *Piper umbellatum* L. frente a las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

II. GENERALIDADES

2.1. Especies

2.1.1. *Hyptis eriocephala* Benth.

2.1.1.1. Taxonomía

La especie *Hyptis eriocephala* Benth pertenece al género *Hyptis* de la familia Lamiaceae. El género *Hyptis* contiene aproximadamente 293 especies ¹³.

Clasificación Taxonómica (Ver Anexo 1):

- REINO: Plantae
- DIVISION: Magnoliophyta
- CLASE: Magnolopsida
- SUBCLASE: Asteridae
- ORDEN: Lamiales
- FAMILIA: Lamiaceae
- GENERO: *Hyptis*
- ESPECIE: *Hyptis eriocephala* Benth

Nombre común: Poleo blanco.

Descripción: Un estudio realizado el año 2011 en Perú menciona las características botánicas para la especie *Hyptis eriocephala* Benth, que la describe como; hierbas con tallos tetraédricos y erectos, con presencia de hojas en el tercio superior, hojas basales con peciolo de 1-3 cm, hojas con forma ovada de ápice agudo y borde dentado con pubescencias en el haz y envés, presencia de flores pequeñas con cáliz morado y corola pequeña ¹⁴. (Ver Figura 1)



Figura 1. *Hyptis eriocephala* Benth ¹⁵.

2.1.1.2. Localización geográfica

Su distribución principal se encuentra en Sudamérica y específicamente se han reportado en los siguientes países ¹⁶:

- Perú (Amazonas, La libertad y Piura)
- Ecuador (Chimborazo, Azuay, Imbabura, Loja, Napo y Pichincha)
- Bolivia (Chuquisaca y Cochabamba)

La especie *Hyptis eriocephala* Benth es una planta que crece a una altitud aproximada entre 1200 a 2000 msnm según las bases de datos internacionales ¹⁷. Cabe mencionar que un estudio realizado en el Perú mencionó la localización de *Hyptis eriocephala* Benth en chacras, bordes de camino y acequias en la región Amazonas, con clima templado a una altitud entre 2000 a 2700 msnm ¹⁸.

2.1.1.3. Propiedades farmacognósicas

Las plantas del género *Hyptis* son una fuente importante de constituyentes bioactivos con amplio espectro antimicrobiano, actividad insecticida, entre otras.

Asimismo, algunos metabolitos aislados de este género reportan actividad anticancerígena. A su vez, en hojas y tallos, hay presencia principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenoides, triterpenoides, flavonoides, lignanos entre otros; es el contenido de terpenoides el que varía entre especies según su localización geográfica ¹⁹. Por ejemplo, un estudio en Brasil de los cultivos de *Hyptis suaveolens* en menor altitud produjeron sesquiterpenos en mayor porcentaje ²⁰. En Venezuela se identificaron 35 metabolitos en las hojas y 30 metabolitos en las flores de *Hyptis suaveolens* mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrofotómetro de masas, siendo los más relevantes el 1,8 – cineol, fenchona, biciclogermacreno y D-germacreno en ambas estructuras vegetales ²¹.

Hyptis verticillata Jacp. es usada como planta medicinal en América Central por su actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, modulador hormonal, etc. Estudios adicionales han identificado actividad anticancerígena, acaricida e insecticida ²².

Hyptis eriocephala Benth fue mencionada como hierba medicinal nativa de la región Amazonas en Perú, con el nombre vulgar de “Shispasaccha” ¹⁸.

La literatura científica reporta estudios de otras especies del género *Hyptis* a las que se atribuyen diversas bondades como su actividad antimicrobiana ^{21, 22}, pero ningún estudio evaluó la actividad antimicrobiana de la especie *Hyptis eriocephala* Benth.

2.1.2. *Piper umbellatum* L.

La familia Piperaceae cuenta aproximadamente con 14 géneros entre los cuales destaca el género *Piper* por sus diferentes aplicaciones entre ellas el uso como

plantas medicinales. Se reconocen alrededor de 1000 especies del género *Piper*, de los cuales solo un reducido número de especies cuentan con estudios de caracterización química ²³.

Las especies del género *Piper* se distribuyen principalmente en zonas tropicales y subtropicales del mundo ²³.

En Mesoamérica y América del Sur se los puede mencionar con nombres comunes tales como cigarrillo, hoja de estrella, pata de vaca, Santa María ²⁴, o como Cordoncillo. En el Perú, *Piper umbellatum* L. es conocido principalmente con el nombre común de “Santa María” y en las zonas amazónicas de la selva peruana tiene el nombre común de “Corarnopan”, o’ mueretspan popnor (en lengua Yanesha) ²⁵.

2.1.2.1. Taxonomía

Piper umbellatum L. es una especie del género *Piper* que fue mencionada por primera vez en 1753 por Carl Von Linnaeus en su libro Species Plantarum ²⁴.

Clasificación Taxonómica (Ver Anexo 2):

- REINO: Plantae
- DIVISION: Magnoliophyta
- CLASE: Magnolopsida
- SUBCLASE: Magnoliidae
- ORDEN: Piperales
- FAMILIA: Piperaceae
- GENERO: *Piper*
- ESPECIE: *Piper umbellatum* L.

Nombre común: Santa María.

Descripción: *Piper umbellatum* L. puede describirse como un arbusto aromático con hojas perennes. Hoja en forma ovada, hasta 42 x 40 cm, con nervaduras de entre 11 a 15. Sus hojas cuentan con pocos pelos en ambas superficies. Pueden presentar Inflorescencias en grupos umbellados de 2 a 8 espigas, con presencia de brotes axilares sin hojas, además el color de las inflorescencias tiene un aspecto de color blanco cremoso ^{26, 27}. (Ver Figura 2)



Figura 2. *Piper umbellatum* L. ^{28,29}.

2.1.2.2. Distribución geográfica

Su distribución es principalmente en zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial donde se destaca su presencia en América del Sur, Mesoamérica, África y Sureste de Asia ^{24,30}.

En el Perú, la distribución geográfica específicamente de *Piper umbellatum* se reporta en el Departamento de Amazonas, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Pasco, San Martín y Ucayali, a una altitud de entre 0 a 2500 m.s.n.m. según el Inventario Nacional de Plantas Medicinales ²⁵ (Ver Anexo 3).

Es importante señalar que la bibliografía menciona variaciones en la composición química según la locación geográfica de las especies del género *Piper* en América Latina ²³. Por lo cual, es importante señalar siempre en qué región o país fue recolectada la muestra para los estudios que mencionen algún tipo de actividad de *Piper umbellatum* L.

2.1.2.3. Propiedades farmacognósicas

El género *Piper* es ampliamente conocido por sus diversos usos como plantas medicinales y aromáticas, siendo empleadas principalmente como: repelente de insectos, larvicidas, antimicrobianos, entre otros. Este género tiene una alta complejidad químico-farmacológica y presentan compuestos como monoterpenos, sesquiterpenos y arilpropanoides que sustentan el uso como plantas medicinales ^{31, 32}.

Los estudios previos para las especies del género *Piper* mencionan las siguientes propiedades farmacognósicas, tales como: antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, anticancerígeno, antidiabético, anti-*Helicobacter pylori*, antiulceroso, anti protozoos, insecticida, anestésico local, diurético y estrogénico para la salud de la mujer ^{33, 34}.

Un estudio realizado en Panamá mencionó el uso etnomedicinal de *Piper arboreum*, *Piper auritum*, *Piper Cordulatum*, *Piper hispidum*, *Piper dariense*, *Piper multiplinervium* y *Piper umbellatum* para el dolor hepático, resfriado común, infecciones de la piel, insecticida, mordeduras de serpientes, diferentes tipos de dolores, dolencias de la piel, curación de heridas, reumatismo, salud de la mujer, antipirético y antiinflamatorio ³³.

Los extractos etanólicos y metanólicos de *Piper umbellatum* presentan actividad frente a levaduras. Estos mismos extractos no tuvieron efectos de toxicidad frente a células de mamíferos ³⁴.

En el Perú, las comunidades amazónicas lo utilizan como planta medicinal para los forúnculos, heridas y picaduras de raya ²⁵. Se conoce que las hojas de *Piper umbellatum* son usadas como purgante ²⁷. Algunas comunidades indígenas utilizan la planta de *Piper umbellatum* como relajante muscular durante el parto ³².

Los aceites esenciales y extractos etanólicos de *Piper umbellatum* presentan actividad antibacteriana ³⁵. Da Silva y col. confirmaron la actividad antibacteriana y la baja toxicidad de *Piper umbellatum*. Además, se evidenció que los flavonoides generan un cambio en la permeabilidad de la pared celular y membrana citoplasmática de las bacterias ³⁶.

Las hojas de *Piper umbellatum* mostraron un alto contenido de monoterpenos mayoritariamente de α -pineno, β -pineno y (E)-nerolidol ^{23,37-39}. Y en las semillas se encontraron un gran porcentaje de taninos, saponinas, glicósidos cardioactivos, alcaloides y aminoácidos ³⁵.

Piper nigrum mostró actividad de inhibición del quorum-sensing (QS) ⁴⁰ el cual es un tipo de comunicación de la expresión de virulencia entre las células y es una característica de las bacterias formadoras de biopelículas. Así mismo, otras especies del género *Piper* también demostraron actividad inhibitoria del QS ⁴¹. *Piper betle*, *Piper sarmentosum* y *Piper caninum* mostraron actividad antibacteriana de amplio espectro, inhibición del QS e incremento de la actividad

de las tirosinasas, por lo que también son utilizadas como plantas medicinales

30.

En resumen, los estudios de *Piper umbellatum* indican una actividad antimicrobiana, sin embargo, no se reporta estudios relacionados a una actividad sobre la formación de biopelículas.

2.2. Biopelículas bacterianas

Las bacterias son ampliamente conocidas por su capacidad de adaptación en medios hostiles. Es así que la vida planctónica de las bacterias, es decir bacterias en libre flotación percibidas como entidades aisladas y sin comunicación entre sí, no es la forma de vida más común en la naturaleza sino más bien que el 99% de las bacterias viven en forma social y con una alta interacción o comunicación entre la misma especie o incluso entre especies distintas ⁴².

La capacidad de formación de biopelículas en las bacterias no está restringida a una especie en específico, sino que dependerá de las condiciones del medio. Una misma bacteria pueden vivir en forma planctónica o formando biopelículas

43.

El avance de la tecnología ha permitido conocer más sobre los detalles de la ultraestructura de las biopelículas y su funcionamiento como comunidad, tal es así que hoy sabemos que las biopelículas son comunidades complejas de un grupo de células adheridas a superficies vivas o inertes que a su vez están encerradas en una matriz polimérica (a modo de protección al medio externo)

con canales internos de agua (a modo de comunicación y redistribución de recursos) ^{44, 45}.

2.2.1. Definición de biopelículas

Las definiciones de biopelículas bacterianas fueron evolucionando en el tiempo conforme se descubrían nuevas características. En los últimos años la biología molecular y microscopía electrónica permitieron definiciones más amplias al conocer más detalles de la ultra estructura de las biopelículas ^{1, 4}.

El primero en observar biopelículas posiblemente fue Van Leeuwenhoek al examinar la placa de sus propios dientes, en el siglo XVII ^{2,11,12}.

Marshall en 1976 notó “fibrillas de polímero extracelular muy finas” que anclaban bacterias a las superficies ⁴².

Costerton en 1985 menciona por primera vez el término de “biopelícula” en la literatura médica ^{10,46}.

Se define a las biopelículas como comunidades que crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido que se adhieren a tejidos vivos o superficies inertes, y que muestran un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y transcripción de genes ⁴.

También se puede considerar a las biopelículas según lo mencionado por Sarduy y col. como: *“Un conjunto de biomasa con microcirculación, que permite a las diferentes comunidades bióticas complementarse nutricionalmente. Es una unidad sellada, englobada en polisacáridos extracelulares, que le confiere resistencia ante las defensas del huésped y los antibióticos”* ⁴⁷.

2.2.2. Estructura de las biopelículas

La estructura de una biopelículas dependerá del sustrato o superficie donde se fije, lo que conlleva a la formación de ambientes fisicoquímicamente heterogéneos y las bacterias de las biopelículas mostrarán características distintas a las planctónicas ⁴⁸.

Una biopelícula está constituida principalmente por agua en un 97%, células bacterianas y productos de las células bacterianas. Así mismo, para entender la heterogeneidad y la arquitectura tridimensional de una biopelícula se observan 3 patrones químicos ¹:

- El patrón de sustrato metabólico; Mayor concentración en el exterior de la biopelícula y menor en el interior ¹.
- Patrón de producto metabólico; Menor concentración en el exterior de la biopelícula y mayor en el interior ¹.
- Patrón de intermediarios metabólicos; Mayor concentración en la parte colindante a la fase acuosa ¹.

Estos 3 patrones generan que dentro de una biopelícula existan diferentes rangos de pH y variaciones de oxígeno, lo que permite la coexistencia de bacterias aerobias, anaerobias o facultativas en diferentes estratos de una misma biopelícula. Así también se puede encontrar en una biopelícula a bacterias con diferentes susceptibilidades frente a los antibióticos ⁴⁹.

La estructura de las biopelículas pueden ser explicada por el modelo del Canal de Agua que se detalla a continuación:

Modelo del Canal de Agua: Una vez que las bacterias se fijan a la superficie comienzan a producir moléculas estructurales (EPS) y aparecen las primeras microcolonias en forma de hongo o cono que luego se irán uniendo entre sí. Posteriormente, se fusionan mediante unos “tallos” de EPS para formar canales de agua que son las ramificaciones que interconectarían la arquitectura interna de una Biopelícula ⁵⁰⁻⁵².

Por medio de un microscopio de láser confocal (que permite observar una biopelícula in vivo, en tiempo real y completamente hidratado), se evidenciaron comunidades bacterianas organizadas en forma de seta o torre las que se muestran separadas por microcanales de agua o de fluidos ^{42,53-55}.

Las bacterias más profundas de una biopelícula tienen un estado metabólico disminuido lo que les brinda la ventaja de ser menos susceptibles a los antibióticos. Además, estas bacterias no pueden ser alcanzadas por anticuerpos, células del sistema inmunológico y/o antibióticos ⁵³.

2.2.3. Etapas de la formación de biopelículas

Las bacterias pueden adherirse a superficies donde podrían o no formar biopelículas. Es decir, la fase inicial para la formación de biopelículas se origina cuando algunas bacterias en estado planctónico frente a condiciones de estrés se adhieren a superficies para la supervivencia formando comunidades ⁵⁶.

Factores genéticos y ambientales: Según la especie bacteriana es fundamental la expresión de ciertos genes que las doten de características para poder unirse a superficies bióticas o abióticas en una primera etapa, tales como: movilidad (principalmente en gram-negativas), el tipo de proteínas de membrana, polisacáridos extracelulares (principalmente en gram-positivas), moléculas de

señalización. Las señales ambientales regulan la formación de biopelículas, estas pueden ser: la disponibilidad de nutrientes, presencia de oxígeno, temperatura y pH ⁵². (Ver figura 3)

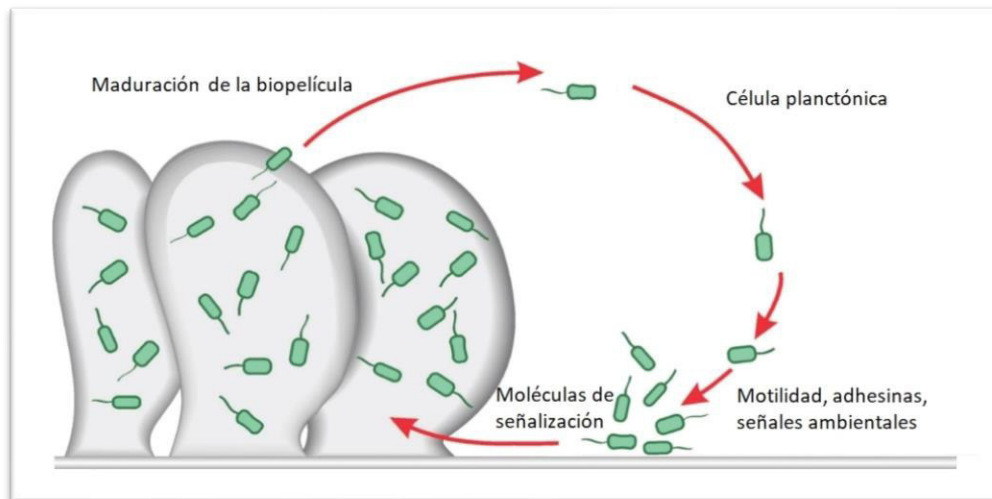


Figura 3. Factores genéticos y ambientales para la formación de biopelículas.

Modificado de Marić S, y col ⁵².

Podemos agrupar en 3 fases de la formación de biopelículas:

Fase 1: Adhesión reversible a la superficie: Es la fase donde la bacteria libre se adhiere a la superficie y luego puede desprenderse. Cambian las propiedades fisicoquímicas de la interfase sustrato/fluido para permitir la adhesión de la bacteria sobre la superficie ⁵⁷.

Las bacterias gram-negativas hacen uso de sus flagelos, pilis, fimbrias tipo I y IV o del curli para lograr anclarse a la superficie y vencer las fuerzas de repulsión hidrofóbicas. Las bacterias gram-positivas inmóviles como *estafilococos*, *estreptococos* y *micobacterias* hacen uso de adhesinas (AtlE, Bap, Esp) en una primera etapa de adherencia ⁵⁸.

Para los casos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* son fundamentales unos componentes bacterianos superficiales que son capaces de unirse a proteínas humanas, a los que se denominan “Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz” o MSCRAMM por sus siglas del inglés “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules” ⁵⁹. Para los estafilococos la principal molécula que les permite la adhesión intercelular es el polisacárido intercelular adhesina (PIA) que químicamente es una poli-N-acetilglucosamina y junto al ácido teicoico formarían posteriormente la matriz extracelular de la biopelícula (Slime) siempre y cuando avancen a la etapa de adhesión irreversible ⁶⁰.

Fase 2: Adhesión irreversible a la superficie: Cuando las bacterias adheridas comienzan a multiplicarse sobre la superficie tienden a posicionarse más firmemente, mostrando nuevos patrones de expresión génica buscando la supervivencia ⁵⁷. La comunicación bacteriana mediante el QS es fundamental para estos cambios de patrones de la expresión génica ⁶¹.

Fase 3: Biopelícula/matriz protectora viscosa o fase de maduración: Cuando las bacterias se encuentran firmemente adheridas, se comienza a segregar una sustancia viscosa denominada Exopolisacárido. Es una matriz protectora (A veces denominada “limo”) que permite que pequeñas colonias de bacterias inicien la formación de la biopelícula. Comienza la formación de canales o poros y la biopelícula redistribuye a las bacterias en el sustrato ⁵⁷.

Composición del Exopolisacárido: El exopolisacárido EPS es el 90% de la masa anhidra de las biopelículas y está compuesta por polisacáridos, proteínas, glucolípidos y ADN bacteriano, pero pueden variar de acuerdo al microorganismo

que lo produzca. El ADN bacteriano liberado en el EPS sería un componente estructural importante para la matriz de EPS de la biopelícula. Las proteínas y enzimas son responsables de la adhesión firme sobre las heridas en el caso de superficies de tejidos vivos ^{44,58}.

Función del Exopolisacárido: Es el responsable de mantener la arquitectura tridimensional de la comunidad que funciona como una barrera de defensa (frente al sistema inmune del hospedero, antibióticos, estrés del ambiente, etc). Dentro de la biopelícula, el EPS cumple la función de soporte para la comunicación célula-célula mediante el proceso del QS ⁵⁸.

Finalmente, las biopelículas maduras excretan bacterias planctónicas, microcolonias y fragmentos de biopelículas que se dispersan y adhieren a otras superficies formando nuevas biopelículas ⁵⁷. (Ver figura 4).

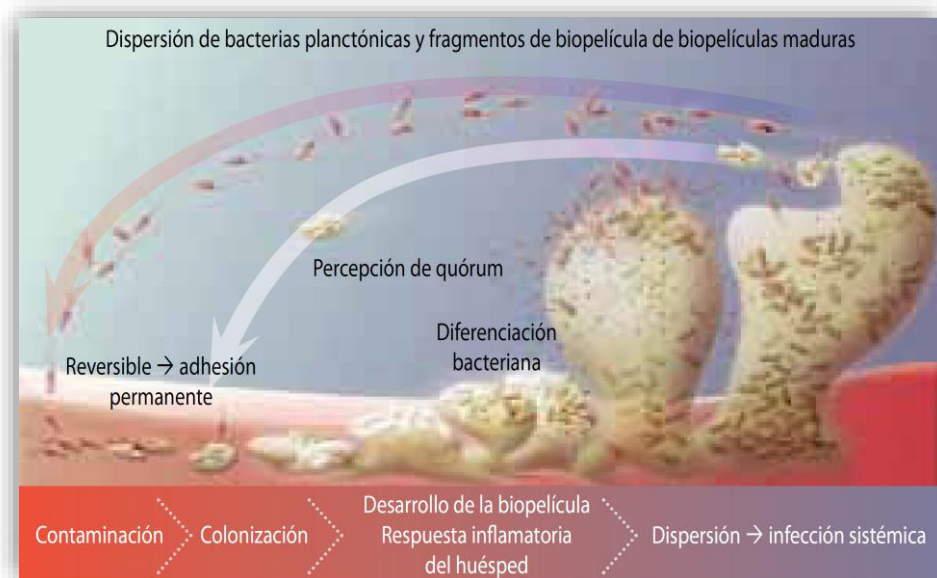


Figura 4. Representación esquemática de la formación de biopelículas.

Adaptado de Philips P, y col ⁵⁷.

2.2.4. Propiedades de las biopelículas

Las bacterias formadoras de biopelículas muestran características novedosas cuando se encuentran viviendo en comunidades:

Heterogeneidad fisiológica, química y genética: Las bacterias dentro de la biopelícula expresan características distintas a las que muestran en su estado planctónico ⁴⁸. Dentro de una biopelícula se encuentran micro ambientes donde las condiciones fisicoquímicas varían dependiendo de los requerimientos de la comunidad bacteriana con lo que pueden responder no homogéneamente y de forma adaptativa a las condiciones externas. Las novedosas expresiones fenotípicas en una biopelícula pueden explicarse porque ocurren variaciones genéticas a través de mutaciones o recombinaciones. Las variaciones génicas ocurren en subpoblaciones dentro de una biopelícula ⁴⁹.

Modificación del micro ambiente: Pueden variar el pH según sus necesidades metabólicas. Pueden permitir la vida de bacterias anaerobias en micro ambientes de una biopelícula a pesar de estar presente el oxígeno disuelto en el medio líquido ⁵⁵.

Sinergismo: Diferentes especies de bacterias y/o hongos puede formar una sola comunidad (biopelícula) en simbiosis, con ventajas como; resistencia pasiva, cooperación metabólica (comparten nutrientes según de necesidad de cada especie), sistemas de QS y un mayor pool de genes que les permite una alta adaptación y supervivencia. En biopelículas polimicrobianas el sinergismo genera infecciones más severas, y como ejemplo tenemos a las biopelículas conformadas por *Pseudomonas aeruginosa* junto a *Staphylococcus aureus* que incrementan la tasa de infección ⁶².

Competencia: Por la adhesión, por los nutrientes, factores de crecimiento y espacios. Podría parecer contradictorio con el sinergismo, pero en realidad la competencia, en determinadas circunstancias, origina la producción de antibióticos, bactericidas, sideróforos, lisosomas, proteasas y alteración del pH mediante la producción de ácidos orgánicos tales como ácido butírico y ácido propiónico ⁵⁵.

Antagonismo: Las biopelículas también pueden afrontar un desafío para su supervivencia cuando se encuentran dos especies bacterianas que producen sustancias antagónicas. Deberán evitar colonizar junto a especies antagónicas y por otro lado también pueden llegar a inhibir o destruir a la especie antagónica mediante factores como el peróxido de hidrogeno o bactericidas ⁵⁵.

Quorum - Sensing (QS): Es un tipo de comunicación célula-célula que regula la expresión de genes en un medio de alta densidad bacteriana como es el caso de las biopelículas. La estrecha proximidad entre células de una biopelícula facilita este sistema de comunicación que funciona debido a que cada bacteria que se une a la biopelícula produce una molécula señal (auto-inductor) que envía el mensaje “yo estoy aquí” a las demás bacterias cercanas lo que conllevará a una diferenciación con nuevas características dentro de la comunidad. Se entiende por “quórum” al número mínimo de bacterias requerido para tomar la decisión de iniciar la expresión de genes ^{11, 12}.

Cuando los microorganismos se comunican por QS secretan auto inductores como la acil-homoserina-lactonas generalmente en bacterias gram-negativas y oligopéptidos modificados en bacterias gram-positivas. Cabe resaltar que el

quorum sensing es necesario para la etapa de maduración de las biopelículas y para la expresión de genes de factores de virulencia ¹².

Resistencia bacteriana: Las biopelículas cuentan con una estructura organizacional que las blindan de los mecanismos de defensa del huésped y de antibióticos externos. Los mecanismos de defensa del huésped no pueden fagocitarlos puesto que las biopelículas son demasiado grandes, y además tienen una barrera física (Principalmente de EPS y los microambientes internos) que impiden el ingreso de sustancias de defensa o de antibióticos externos ^{1,51}.

Desde el punto de vista médico, el QS sería una expresión fenotípica de virulencia que genera una resistencia a los antibióticos principalmente ^{1,51}.

La resistencia bacteriana de una biopelícula estaría explicada por los siguientes mecanismos:

- Penetración lenta o incompleta del antibiótico ^{1,10,12}.
- Baja actividad metabólica en bacterias de una biopelícula; las bajas concentraciones de oxígeno y nutrientes generan que el proceso de mitosis se detenga dejando de ser susceptibles a los antibióticos que actúan a este nivel ^{1,10,12}.
- Existencia de “nichos anaeróbicos” en la profundidad de una biopelícula; El oxígeno es consumido en su totalidad por las células superficiales de una biopelícula, generando que las células más profundas no cuenten con oxígeno. Los antibióticos como aminoglicósidos tienen menor eficacia en condiciones anaerobias que en condiciones aerobias de una misma especie bacteriana ^{1,10}.

2.2.5. Biopelículas como problema de salud pública

La importancia en salud pública relacionada a las biopelículas fue reportada el año 2008 en los Estados Unidos; donde se mencionan alrededor de 99 mil muertes al año y 1.7 millones de infecciones asociadas a biopelículas. Ese mismo año, en Europa se reportaron 50 mil muertes al año y 3 millones de pacientes con infecciones asociadas a biopelículas ¹. En el Perú y demás países latinoamericanos, no existen reportes que permitan la asociación de infecciones por biopelículas.

Las biopelículas cuentan con una serie de características que las hacen responsables de diversos problemas de salud en los humanos. Tales factores como la resistencia a los antibióticos, incremento de infecciones recurrentes, problemas intrahospitalarios por contaminación de dispositivos médicos y ser responsables de la dificultad de cicatrización de heridas, hacen que las biopelículas sean un problema en la práctica médica ¹.

Las infecciones recurrentes, que desencadenan infecciones crónicas son un problema de salud que ha llamado la atención de los médicos puesto que las infecciones por biopelículas no responden a los antibióticos y no cuentan con posibilidad de inmunización en la población. Las infecciones que implican a las biopelículas son: otitis media, neumonía en la fibrosis quística, endocarditis, periodontitis, caries dental, osteomielitis, entre otras. Así mismo, estas biopelículas serían producidas principalmente por especies bacterianas como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, cocos gran-positivos, bacterias anaerobias gram-negativas e incluso algunas especies de hongos ¹.

Las infecciones agudas en general se relacionarían a bacterias planctónicas que son fácilmente combatidas por los antibióticos convencionales, en contraste, las infecciones crónicas estarían relacionadas con bacterias que alternan a la forma de biopelículas ⁴³. Costerton y Stewart fueron quienes propusieron un modelo para explicar aquellas infecciones crónicas que serían causadas por biopelículas ⁶².

Las biopelículas pueden generar enfermedades nosocomiales con altos costos para la salud pública porque son capaces de adherirse sobre superficies inertes, logrando colonizar y desarrollarse sobre la superficie de los dispositivos médicos tales como: lentes de contacto, catéteres venosos, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, válvulas cardíacas, marcapasos, catéteres de diálisis, prótesis de cadera, etc. Lastimosamente, en algunos casos pueden derivar en infecciones sistémicas ¹.

Las biopelículas son responsables de retrasar la cicatrización de las heridas, dificultando el tratamiento con antibióticos convencionales. Las heridas crónicas de la piel evaluadas mediante pruebas de laboratorio presentan baja carga bacteriana, puesto que estas pruebas están estandarizadas para bacterias en estado planctónico y no para identificar bacterias de las biopelículas. Las biopelículas interrumpen la cicatrización de las heridas porque inicialmente inducen una respuesta inflamatoria crónica atrayendo numerosos neutrófilos y macrófagos los mismos que producen Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y proteasas que al final terminan dañando a los tejidos sanos alrededor de la herida ^{1,57}.

2.2.6. Estafilococos formadores de biopelículas con importancia clínica.

El Perú no es ajeno a los problemas intrahospitalarios que pueden ser causados por biopelículas, tales como la resistencia a los antibióticos, retraso en cicatrización de heridas y otras complicaciones. Cabe resaltar que las infecciones nosocomiales y asociadas a catéteres están estrechamente relacionadas a estafilococos. *Staphylococcus aureus* es el principal agente causal de infecciones nosocomiales y el *Staphylococcus epidermidis* es causante de infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos. En nuestro país el ineficiente registro de las infecciones intrahospitalarias brinda un escaso conocimiento sobre la real problemática que causan las infecciones por biopelículas ⁶³.

Además, se ha descrito la relación que tiene las biopelículas con variables clínicas epidemiológicas, donde se observa que algunas biopelículas de estafilococos coagulasa negativa están relacionadas a personas de la tercera edad, a enfermedades crónicas tales como diabetes mellitus y nefropatías crónicas ⁶⁴.

2.2.7. Técnicas para la detección de cepas formadoras de biopelículas

Entre las técnicas cualitativas para la identificación preliminar de cepas formadoras de biopelículas se cuenta con el Método de Agar Rojo de Congo (ARC).

Método de Agar Rojo de Congo (ARC): Este método fue descrito por Freeman y col. en 1989. El medio de cultivo está constituido principalmente por caldo de infusión cerebro corazón, sucrosa, agar-agar y rojo Congo. (Se somete a autoclavado a 121°C por 15 minutos). Luego del sembrado de las cepas en

experimentación, se incuban aeróbicamente a 37° C por 24 horas. Las cepas que desarrollaron colonias de color negro con cristalización seca son positivas para biopelículas y las colonias rosadas son negativas para biopelículas ^{65, 66}.

El método de Agar Rojo de Congo tiene la ventaja de ser un método rápido, reproducible, con alta sensibilidad y especificidad, con la ventaja adicional de mantener viables a las colonias en el medio. Este método puede ser empleado para un tamizaje preliminar de cepas con capacidad formadora de biopelículas por su sencillez ⁶⁴.

Los métodos aplicados en el estudio de biopelículas en superficies abióticas, pueden ser clasificados en los siguientes grupos según Pantanella y col ⁶⁷:

Métodos colorimétricos: Ensayo de Cristal Violeta (CV), Ensayo de DMMB (usa al colorante indicador 1,9-dimethyl methylen blue), Ensayo de FDA (usa al indicador fluorescein-di-acetate), Ensayo de LIVE/DEAD BacLight (usa a los indicadores “Green fluorescent-Syto9” y al “red-fluorescent propidium-iodide”) ⁶⁷.

Métodos metabólicos: Ensayo de Resazurina (usa como colorante indicador al “7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide”), Ensayo XTT (usa al indicador XTT), Ensayo de BioTimer BTA (usa al indicador “rojo de fenol” ⁶⁷.

Ensayos genéticos: PCR; qRT-PCR, FISH ⁶⁷.

Ensayos físicos: Espectrometría de masas, CLSM (Microscopía Confocal Láser de Barrido), CRM (Microscopía Confocal RAMAN), EM (Microscopía electrónica), XM (Microscopía rayos X) ⁶⁷.

Entre los métodos más adaptables que permiten la determinación *in vitro* de la actividad antibacteriana sobre biopelículas tenemos al método de microdilución

en placa con resazurina. El colorante indicador resazurina es más específico para biopelículas a diferencia por ejemplo del colorante indicador Cristal violeta CV el cual puede teñir indistintamente a toda célula bacteriana de *Staphylococcus* ^{68, 69}.

Método de microdilución en placa con resazurina: Fue descrito inicialmente por Sarker et al en el año 2007 para evaluar agentes fitoquímicos con actividad inhibitoria del crecimiento microbiano (solo se menciona bacterias planctónicas) por medio de un reactivo colorante como indicador. Este método utiliza como soporte a una microplaca de poliestireno con 96 pocillos estériles y utiliza principalmente de Caldo Mueller Hinton, solución salina, antibiótico (como control positivo) y emplea a la resazurina como reactivo colorante indicador (también denominado Azul de Alamar) ⁷⁰.

El método descrito por Sarker et al ⁷⁰ fue modificado por Antunes et al ⁷¹. Este último, adiciona una serie de enjuagues de la microplaca con el fin de retirar las bacterias planctónicas y contar solamente con las bacterias que lograron adherirse y crecer sobre las paredes internas de los pocillos de poliestireno, lo que permite evaluar la actividad inhibitoria de crecimiento de las biopelículas ⁹.

El reactivo colorante indicador Resazurina; Su nombre químico es 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide ⁶⁷ conocido también con el nombre de azul de alamar. Es un indicador estable redox de color azul no fluorescente permeable a las membranas celulares y que no causa daño a las células del experimento. La coloración azul no fluorescente de la resazurina es reducida a resofurina por la actividad metabólica de óxido-reductasas (dentro de las células viables) el cual cambia al color rosado mediante un proceso irreversible ^{69,72, 73}. (Ver Figura 5)

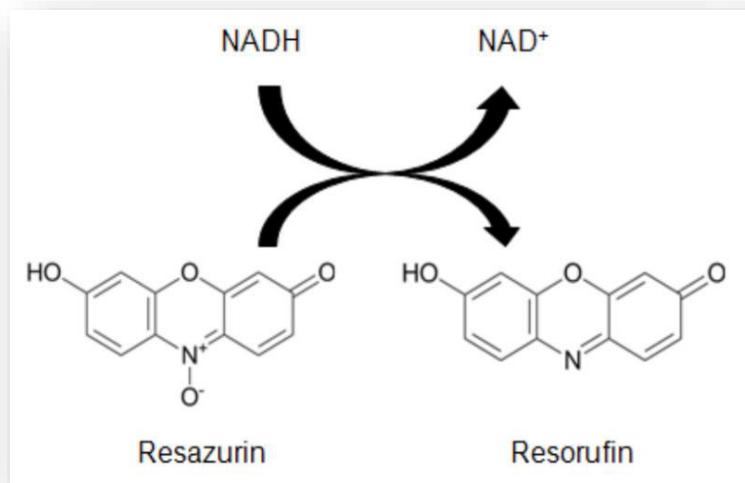


Figura 5. Estructura química de la Resazurina reducida a Resofurina en células viables ⁷³.

Cuando se realizan ensayos microdilución para biopelículas se puede observar un fenómeno denominado “Efecto de borde” que muestra un crecimiento de biopelículas mayor en los pocillos periféricos en comparación a los pocillos centrales, lo cual puede ser explicado por dos razones principales: Primero, porque en los pocillos periféricos existiría mayor contacto con el oxígeno, y en segundo lugar porque habría mayor evaporación del agua que propiciaría que las bacterias planctónicas se adhieran con mayor facilidad a la pared interna del pocillo ⁷⁴.

Los demás métodos para la determinación de la CMI en biopelículas coinciden en la desventaja principal de no diferenciar la coloración en células vivas o muertas. A diferencia de los métodos que no mantienen las células viables, la microdilución en placa con resazurina mantiene viable a los microorganismos en el experimento con biopelículas ^{67, 68,75}.

Para la determinación de actividad antimicrobiana se tiene como punto de referencia a las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) - suplemento M100-S25 que mediante estándares y protocolos de ensayo permiten obtener resultados consistentes y reproducibles cuando se experimente con la susceptibilidad de microorganismos ⁷⁶.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Tipo de estudio

Estudio observacional descriptivo y transversal.

3.2. Partes de las especies

- Hojas y tallos de *Hyptis eriocephala* Benth
- Hojas de *Piper umbellatum* L.

3.3. Cepas bacterianas (Ver Figura 6)

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

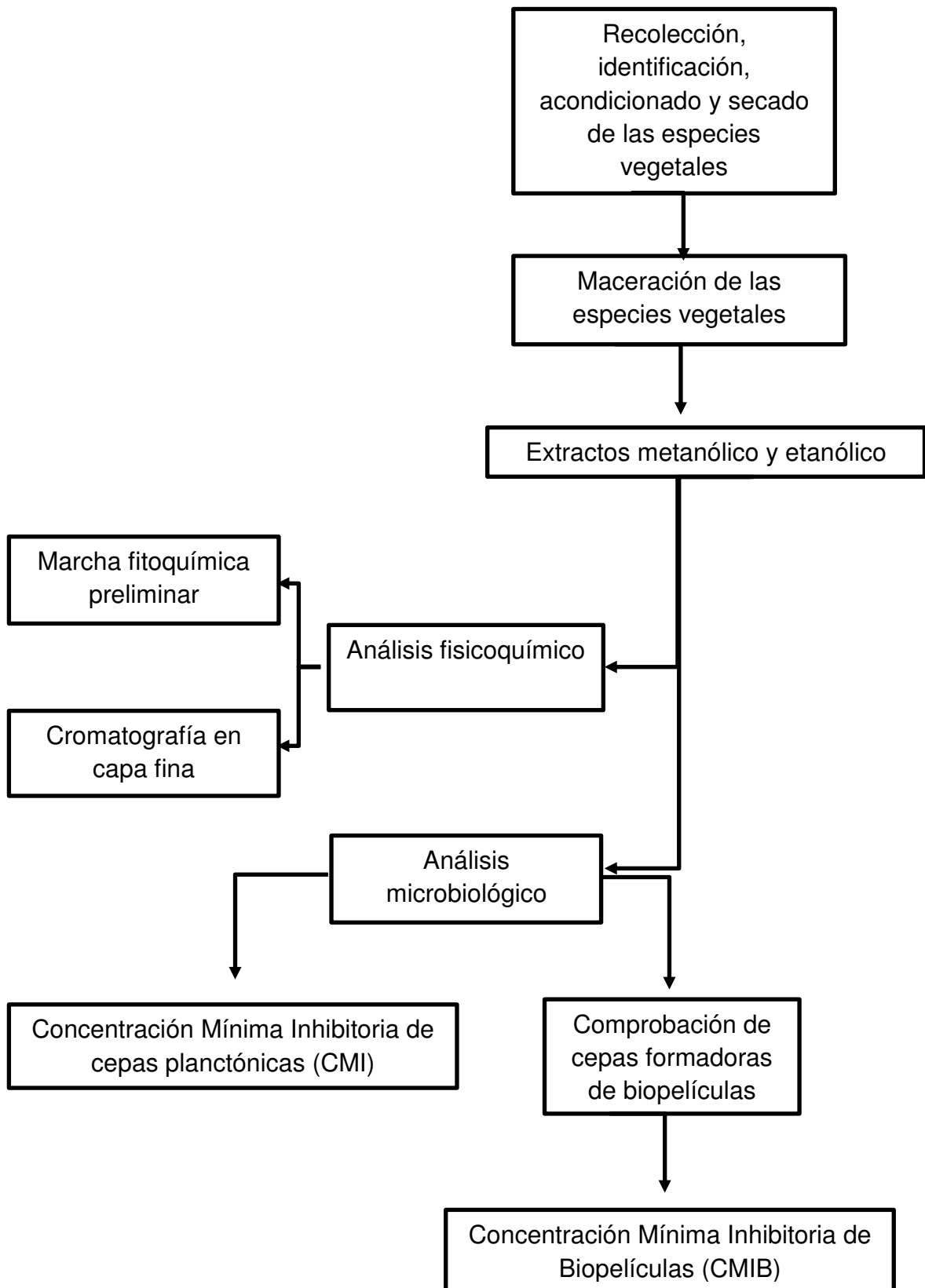


Figura 6. Cepas bacterianas ATCC.

3.4. Materiales y equipos (Ver Anexo 4).

3.5. Método

3.5.1. Flujograma de la parte experimental



3.5.2. Recolección de las especies vegetales

Las plantas se recolectaron en la localidad de Fundo Cedro, distrito de Camporredondo, provincia de Luya (región Amazonas) a una altitud de 1550 msnm entre los meses de mayo y junio del 2016, las cuales se describen en la Tabla 1 y en la Figura 7.

Tabla 1. Plantas seleccionadas por su potencial actividad antibacteriana.

Planta (Nombre científico)	Familia	Nombre común	Partes empleadas
<i>Hyptis eriocephala</i> Benth	Lamiaceae	Poleo blanco	Hojas Tallos
<i>Piper umbellatum</i> L.	Piperaceae	Santa Maria	Hojas

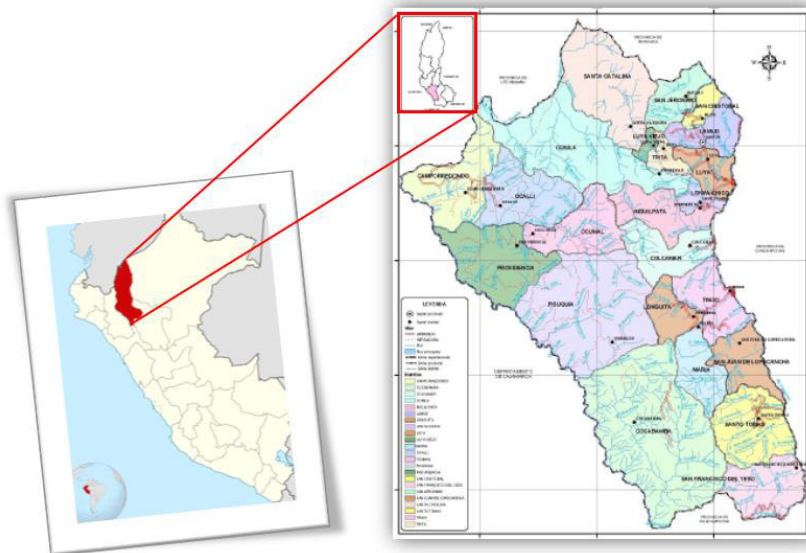


Figura 7. Mapa de la provincia de Luya – Región Amazonas.

3.5.3. Identificación taxonómica de las especies

Se realizó la identificación y clasificación taxonómica por un consultor botánico, quien emitió los Certificados de Identificación Botánica de las especies vegetales de *Hyptis eriocephala* Benth y de *Piper umbellatum* L. para fines de la presente tesis (Anexos 1 y 2).

3.5.4. Acondicionado y secado de las especies vegetales

Las plantas recolectadas fueron acondicionadas en los laboratorios de Microbiología y de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a temperatura ambiente y en sombra durante una semana, estas estructuras fueron pesadas, de este proceso se obtuvo 1.2 kg de material vegetal semifresco de *Hyptis eriocephala* Benth y 1.0 kg de material vegetal semiseco de *Piper umbellatum* L. Estas estructuras fueron sometidas a secado en una estufa de 40 °C, luego se seleccionaron las estructuras vegetales a utilizar según se encuentran detalladas en la tabla N°1.

Finalmente se realizó la reducción de tamaño de partículas con ayuda de un molino de mano con cuchillas N° 21 para las hojas secas y con un molino industrial para los tallos secos. De este proceso se obtuvieron aproximadamente 500 g de material vegetal de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, 200 g de material vegetal de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth y aproximadamente 500 g de material vegetal de hojas de *Piper umbellatum* L.

3.5.5. Preparación de los extractos

3.5.5.1 Etapa de maceración

Se emplearon frascos ámbar con tapa rosca que contenían el material vegetal en polvo. Los extractos fueron obtenidos en frascos macerados con metanol y en frascos macerados con etanol 96%, en una proporción de 1 en 10 P/V para ambos casos ⁹. El tiempo de maceración fue de una semana a temperatura ambiente con agitación manual por dos veces al día ⁷⁷. Después de este tiempo los macerados fueron filtrados a través de papel de filtro y algodón. Estos macerados fueron recolectados en frascos ámbar. Todos los extractos preparados se encuentran detallados en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de extractos etanólicos y metanólicos.

Material vegetal	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS 1:10 P/V					
	<i>Hyptis eriocephala</i> Benth				<i>Piper umbellatum</i>	
Frascos Rotulados	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Parte del Material vegetal	Hojas	Hojas	Tallos	Tallos	Hojas	Hojas
Peso utilizado	250 g	250 g	100 g	100 g	250 g	250 g
Solvente orgánicos	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol
Volumen de Solvente orgánico	2250 mL	2250 mL	900 mL	900 mL	2250 mL	2250 mL

3.5.5.2 Etapa de concentración

Se realizó la concentración de los volúmenes filtrados mediante un equipo de Rotavapor a 40°C con la finalidad de evaporar y eliminar los solventes empleados ⁷⁸. Una vez que fueron obtenidos los extractos concentrados, estos fueron transferidos a placas Petri para ser pesados y almacenados en

condiciones ambientales con protección de la luz. La Tabla 3 y la Figura 8 muestran el detalle de los pesos obtenidos.

Tabla 3. Pesos de los extractos concentrados.

Material vegetal	Extractos concentrados					
	<i>Hyptis eriocephala</i> Benth				<i>Piper umbellatum</i> L.	
Extractos	Etanólico	Metanólico	Etanólico	Metanólico	Etanólico	Metanólico
Muestras concentradas	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso (g)	22 g	24 g	19 g	22 g	28.5 g	26 g



Figura 8. Extractos en proceso de concentración.

3.5.6. Ensayos Fitoquímicos

3.5.6.1 Preparación de la muestra

Se pesaron 100 mg de cada extracto obtenido, los cuales fueron reconstituidos con 10 mL de metanol o alcohol 96%, según indica la Tabla 4. Estos extractos fueron filtrados para luego ser colocados en pequeños frascos ámbar y almacenados en condiciones ambientales, para luego ser llevados al Centro de Control Analítico CENPROFARMA de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM para la ejecución de los ensayos fisicoquímicos, con fechas 10 y 11 de octubre del 2017. (ANEXO 5- 10).

Tabla 4. Volumen de extractos filtrados para los Ensayos Fitoquímicos.

Material vegetal	MUESTRAS PARA EL ENSAYO FITOQUÍMICO					
	<i>Hyptis eriocephala</i> Benth				<i>Piper umbellatum</i> L.	
Frascos Rotulados	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Diluyente	Etanol 96%	Metanol	Etanol 96%	Metanol	Etanol 96%	Metanol
Volumen para el ensayo fitoquímico	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

3.5.6.2 Marcha Fitoquímica

Se realizaron los ensayos con la finalidad de identificar cualitativamente metabolitos como Antocianinas (Reacción con ácido sulfóxico), Alcaloides (Reactivo de Dragendorff), Lactonas (Reactivo de Baljet), Flavonoides (Reactivo de Shinoda), Cardenólidos (Kedde), Esteroides (Liebermann – Burchard), Saponinas (Espuma), Taninos (Cloruro férrico), Triterpenos (Liebermann – Burchard), Azúcares reductores (Fehling) y fenoles (Cloruro férrico) ⁷⁹.

La interpretación de resultados fue cualitativa mediante la observación visual según la siguiente Tabla 5:

Tabla 5. Interpretación de resultados de la Marcha Fitoquímica.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	
SIGNO	SIGNIFICADO
+++	Reacción muy evidente
++	Reacción evidente
+	Reacción poco evidente, pero aceptable.
-	No hubo reacción.

3.5.6.3. Cromatografía en capa fina

3.5.6.3.1 Condiciones cromatográficas

Se tiene como fase móvil la mezcla de Cloroformo: Metanol: Agua (80: 18: 2) y como fase estacionaria se utilizaron cromatofolios de sílica gel de 20 cm x 10 cm x 0.25 m. ⁷⁸. La técnica aplicada fue de cromatografía ascendente con desarrollo simple y se tuvo como tiempo de corrida aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Las muestras preparadas fueron sembradas con 5 µL de inyección, las cuales fueron fijadas con ayuda de aire. Posteriormente se pasó al revelado de los metabolitos de interés con reveladores específicos para cada uno.

3.5.6.3.2 Revelado y lectura de resultados

Para el revelado de flavonoides: Se usó una lámpara de UV con observaciones de fluorescencia a 254nm y 366nm ⁷⁸, el resultado positivo se indica con una observación de fluorescencia amarilla, la intensidad de la fluorescencia se intensifica al adicionar polvo de cloruro de aluminio.

Para el revelado de Alcaloides: Se utilizó el reactivo de Dragendorff, con una lectura positiva de bandas anaranjadas.

Para el revelado de Cumarinas: Se utilizó potasa alcohólica al 5%, con una lectura positiva de color rojo oscuro.

Para el revelado de Terpenos: Se utilizó el reactivo de anisaldehído / ácido sulfúrico con un posterior calentamiento en estufa a 120 °C por 5 min, con una lectura positiva de bandas púrpuras.

3.5.7. Ensayo microbiológico

El ensayo microbiológico se realizó por el método de microdilución en placa que utiliza microplacas de poliestireno de 96 pocillos estéril con resazurina como indicador colorimétrico, en los cuales se ensayaron los extractos y controles para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de cepas planctónicas (CMI) y la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) frente a los microorganismos de estudio ^{9,70,71}.

3.5.7.1 Microorganismos de estudio

Para los ensayos microbiológicos se emplearon las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 las mismas que fueron obtenidas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

3.5.7.2 Preparación de muestra de los extractos

Luego de la etapa de la concentración de los extractos, se utilizó un peso correspondiente que fue resuspendido en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de **100 mg/mL**. Estos extractos resuspendidos permanecieron almacenados en oscuridad a 4°C, en la refrigeradora del Laboratorio de Microbiología FFYB-UNMSM.

Solución madre para la determinación de CMI: De los viales con extractos resuspendidos se preparó una dilución de 1: 50 (40 µL diluidos en 2000 µL) hasta obtener una concentración de **4000 µg/mL**.

Solución madre para la determinación de CMIB: De los viales con extractos resuspendidos se preparó una dilución de 1: 50 (20 µL diluidos en 1000 µL) hasta obtener una concentración de **2000 µg/mL**.

3.5.7.3 Preparación del indicador Resazurina

Se pesó 500 mg de resazurina y se disuelve en 25 mL de agua destilada con el fin de obtener una solución de resazurina de 20 mg/mL que se incorpora en la preparación del inóculo. Esta preparación de resazurina se basó en el método descrito por Liu y col.⁸⁰.

De la solución de resazurina de 20 mg/mL se tomó 10 µL que se diluyen en 2 mL de Caldo Mueller Hinton. Esta dilución de indicador de resazurina fue empleada para el Control de Esterilidad.

3.5.7.4 Preparación de los controles

El control positivo empleado para determinar CMI y CMIB fue el antibiótico Ciprofloxacino. La solución madre de Ciprofloxacino, en cumplimiento con los estándares del CLSI, fue preparada por 100 veces la concentración ensayada en el experimento, fue así que se empleó 34.2 mg de Ciprofloxacino 94.05% (T/C) disueltos en 5 mL de agua estéril para obtener una concentración final de 6.4 mg/mL. La solución madre de Ciprofloxacino fue preparada en diluciones seriales con caldo Mueller Hinton para obtener concentraciones finales de entre 0.25 - 128 µg/mL.^{70,76,81}.

Para el caso del control de esterilidad se utilizó únicamente una dilución de resazurina en caldo Mueller Hinton^{70,76}.

Finalmente el control de crecimiento utilizó una dilución de resazurina en caldo Mueller Hinton con los microorganismos en estudio.^{70,76}

3.5.7.5 Preparación del inóculo

Las cepas bacterianas fueron reactivadas en Agar Triptona Soya (TSA) incubadas a 37 °C por 18 - 24 h. Cierta cantidad de colonias se suspendieron en solución salina 0.9% estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland equivalente a una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL⁷⁶. A partir de la concentración anterior de 1.5×10^8 UFC/mL se ajustó visualmente la turbidez hasta alcanzar una concentración final del inóculo de 5×10^5 UFC/mL mediante diluciones en caldo Mueller Hinton (Merck)^{70,76}.

A 10 mL de esta concentración final del inóculo se incorpora 50 µL de solución de resazurina de 20 mg/mL. Esta solución final del inóculo con resazurina fue utilizada en el ensayo por microdilución en placa^{9,82}.

3.5.7.6 Diseño de la microplaca

Según las necesidades de nuestro estudio se determinó el siguiente diseño de ubicaciones para cada microplaca del ensayo. Cada microplaca fue ensayada por una sola especie bacteriana frente a las muestras de los extractos de ambas plantas, es decir una microplaca fue utilizada para inóculos de una especie bacteriana y se ensayaron los extractos M1, M2, M3, M4, M5, y M6. Se tuvo en cuenta las ubicaciones apropiadas para el Control de Esterilidad, Control de Crecimiento y para el Control positivo.

Tabla 6. Diseño de la microplaca de poliestireno empleado en el estudio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	CC	M1
B	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	CC	M2
C	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	CC	M3
D	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	CC	M4
E	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	CC	M5
F	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	CC	M6
G	CE	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CC	
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Leyenda: **CE: Control de esterilidad** (Caldo MH + RZ / sin bacteria), **CP: Control positivo** (Ciprofloxacino en diluciones seriales + caldo MH + RZ + bacteria), **CC: Control de crecimiento** (bacteria + caldo MH + RZ). **A-D: Extractos de *Hyptis eriocephala* Benth** / **E-F: Extractos de *Piper umbellatum* L.** (Diluciones seriales del pocillo 2 al 11 + caldo MH + RZ + bacteria). Color rosa indica crecimiento / Color azul indica inhibición de crecimiento. Se siembra 1 especie bacteriana por microplaca. Todos los valores de concentraciones corresponden a la unidad de µg/mL.

3.5.7.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la CMI mediante el método de microdilución en placa se utilizaron microplacas de poliestireno estériles con 96 pocillos de fondo en “U”, sobre los cuales se incorporaron las diluciones seriales de las muestras de los extractos, los controles, el inóculo según el microorganismo junto al indicador resazurina como marcador de células vivas. La incorporación de estas muestras y reactivos se realizó según el diseño de la microplaca (Tabla 6). Para este procedimiento se tuvo en cuenta lo descrito por Sarker y col.⁷⁰ y las modificaciones de Ruiz y col.⁹.

Procedimiento del método de microdilución en placa para CMI

Se incorpora 200 μL de las soluciones finales de muestras y de Ciprofloxacino en cada pocillo en las locaciones de A2 – G2 correspondientemente, según el diseño de la microplaca en la Tabla 6. Se adicionó 100 μL de caldo Mueller Hinton en las locaciones de A3 – G12. Luego se trasvasa 100 μL de la columna 2 a la 3 y se homogenizan. La misma operación se realiza desde la columna 3 hasta la columna 11. A la columna 11 se le retira 100 μL para que todas los pocillos tengan un volumen de 100 μL . Cabe mencionar que la columna 12 corresponde al Control de Crecimiento y solo se le adiciona caldo Mueller Hinton. Finalmente, se adiciona 100 μL de la solución final del inóculo (que ya cuenta con resazurina) en cada pocillo de las locaciones desde A2 hasta G12. La columna 1 correspondiente al Control de Esterilidad fue únicamente adicionada con solución de trabajo de resazurina.

Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones aerobias.

3.5.7.8. Comprobación de las cepas formadoras de biopelículas

Para evaluar la capacidad formadora de biopelículas de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 se utilizó el método Freeman y col. El sembrado en placas se realizó por aislamiento en agar rojo de Congo y se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones aerobias. Las bacterias que desarrollaron colonias de color negro con una consistencia seca cristalina fueron tomadas en cuenta con cepas formadoras de biopelículas y las colonias rosadas se evidencian como bacterias que no forman biopelículas ⁶⁵.

3.5.7.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de cepas formadoras de biopelículas se realizó por el método de microdilución en placa con resazurina descrito por Antunes y col. ⁷¹ y las modificaciones de Ruiz y col. ⁹ el cual fue adaptado a nuestro estudio. Se utilizó microplacas de poliestireno estériles con 96 pocillos de fondo plano.

Procedimiento del método de microdilución en placa para CMIB

El procedimiento fue similar a lo ensayado para la determinación de CMI en cepas planctónicas por el método de microdilución en placa, sin embargo, para el ensayo con biopelículas para determinar el CMIB se adicionó una serie de enjuagues de los pocillos de la microplaca con el fin de retirar bacterias planctónicas y contar con las bacterias que lograron adherirse y formar biopelículas en las paredes internas de los pocillos de poliestireno. Posterior a los enjuagues de los pocillos de la microplaca, se incorporan las diluciones seriales de las muestras de los extractos para enfrentar su actividad inhibitoria del crecimiento frente a las cepas de biopelículas ^{9,71}.

Se incorporó 100 µL de las soluciones finales del inóculo (que ya contiene resazurina) desde las locaciones de A2 – G12 incubándose a 37 °C por 24 h en condiciones aerobias. Se retiró el contenido líquido de las microplacas y se realizó 3 enjuagues consecutivos con solución salina 0.9% para posteriormente ser secados a 37 °C por 30 minutos con la finalidad de contar con las biopelículas adheridas y fijas en las paredes internas de los pocillos.

Se prepara en una segunda microplaca según el procedimiento descrito en el ítem “Procedimiento del método de microdilución en placa para CMI”. De esta segunda microplaca se utilizó 100 µL que se trasvasaron a la primera microplaca donde se encuentran adheridas las biopelículas formadas.

La primera microplaca se incubó a 37 °C por 24 horas. Luego de transcurrido este tiempo, se retira el contenido de cada pocillo y se enjuagan con solución salina estéril 0.9% por 3 veces dejándose secar a 37°C por 30 minutos. Finalmente se incorporó 100 µL de solución de resazurina de 20 mg/ML en las locaciones desde A1 hasta G12. Se procede a la incubación a 37 °C por 60 minutos.

La columna 1 correspondiente al Control de Esterilidad fue únicamente adicionada con dilución de resazurina.

Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones aerobias.

3.5.7.10. Lectura de resultados

Los resultados fueron leídos visualmente. Se registró como resultado positivo a cualquier cambio de color de azul a rosado. Así mismo, los valores de CMI ó CMIB fueron definidos como la menor concentración de un extracto en investigación que impide el cambio de color del indicador resazurina. Se realizaron tres ensayos y el promedio de estos valores fue reportado como CMI ó CMIB según corresponde ⁸³.

Para la lectura del Control positivo Ciprofloxacino se observa las posiciones G2 – G11 con el fin de corroborar la inhibición del crecimiento en estas locaciones de la microplaca. El control de esterilidad ubicado en la columna 1 desde la

posición A1 – G1 corroboran la no contaminación de la microplaca en todo el experimento. Por último el Control de crecimiento localizado en la columna 12 desde la posición A12 – G12 corroboran el crecimiento y viabilidad de los microorganismos ensayados. (Ver tabla 6).

3.5.7.11. Interpretación de resultados de CMI y CMIB

Para los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución en placa con resazurina se tomó en cuenta los parámetros propuestos por Holetz y col ⁸⁴. Se consideró que todos los extractos que mostraron valores de **CMI y CMIB menores o iguales a 1000 µg/mL** tuvieron actividad antibacteriana. Ver Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación de la actividad antibacteriana según valores de la concentración mínima inhibitoria ⁸⁴.

Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria	Actividad antibacteriana
Menor a 100 µg/mL	Buena
100 a menores de 500 µg/mL	Moderada
500 a 1000 µg/mL	Débil
Mayor a 1000 µg/mL	Inactiva

IV. RESULTADOS

4.1. Ensayos Fitoquímicos.

4.1.1. Resultados de la Marcha Fitoquímica preliminar

La tabla 8 y tabla 9 presenta los resultados de la Marcha Fitoquímica Preliminar que se realizó por duplicado a los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. respectivamente:

Tabla 8. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth.

MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR		Muestras de <i>Hyptis eriocephala</i> Benth							
		M1		M2		M3		M4	
METABOLITO	ENSAYO	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Antocianinas	Reacción con ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	N/A
Alcaloides	Dragendorff	++	+++	++	++	++	++	++	N/A
Lactonas	Baljet	++	+++	+	+	+	+	+	N/A
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+	+	+	+	N/A
Cardenólidos	Kedde	-	-	-	-	-	-	-	N/A
Esteroides	Liebermann – Burchard	-	-	-	-	-	-	-	N/A
Saponinas	Espuma	-	-	-	-	-	-	-	N/A
Taninos	Cloruro Férrico	+++	+++	+	+	++	++	+	N/A
Triterpenos	Liebermann – Burchard	+	+	-	-	-	-	-	N/A
Azúcares Reductores	Fehling	-	-	-	-	+	-	-	N/A
Fenoles	Cloruro Férrico	+++	+++	-	-	+	+	+	N/A

Leyenda: +++: Reacción muy evidente, ++: Reacción evidente, +: Reacción poco evidente, pero aceptable, (-): No hubo reacción. N/A: No aplica.

Tabla 9. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los extractos de *Piper umbellatum* L.

MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR		Muestras de <i>Piper umbellatum</i> L.			
		M5		M6	
METABOLITO	ENSAYO	R1	R2	R1	R2
Antocianinas	Reacción con ácido sulfúrico	-	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	++	++	++	++
Lactonas	Baljet	+	++	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	+	+	-
Cardenólidos	Kedde	-	-	-	-
Esteroides	Libermann – Burchard	-	-	-	-
Saponinas	Espuma	-	-	-	-
Taninos	Cloruro Férrico	-	++	+	-
Triterpenos	Libermann – Burchard	-	-	+	-
Azúcares Reductores	Fehling	+	-	+	-
Fenoles	Cloruro Férrico	-	+	+	-

Leyenda: +++: Reacción muy evidente, ++: Reacción evidente, +: Reacción poco evidente, pero aceptable, (-): No hubo reacción. N/A: No aplica.

4.1.2. Análisis de Cromatografía en capa fina.

Los resultados del análisis por cromatografía en capa fina se muestran en la Tabla 10. (ANEXO N° 11).

Tabla 10. Cromatografía en capa fina de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. (Rf de los metabolitos secundarios).

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	<i>Hyptis eriocephala</i> Benth				<i>Piper umbellatum</i> L.	
MUESTRAS	M1	M2	M3	M4	M5	M6
FS: Frente de solvente (cm)	9.5	8.5	9.4	9.5	8.7	9.6
Rf: Alcaloides	N/A	0.741	0.1515	N/A	N/A	0.0900
Rf: Flavonoides		0.8000			0.1264	
	0.7894	0.5764		0.2421	0.2298	
	0.6842	0.4110	0.6364	0.4421	0.3678	0.6060
	0.4210	0.2588		0.8631	0.7471	
		0.1176		0.9263	0.8850	
					0.9310	
Rf: Cumarinas	N/A	0.75	0.2424	N/A	N/A	0.6263
Rf: Terpenos		0.9058			0.9080	
	0.4000	0.7294	0.7575	0.2421	0.7471	0.8000
		0.5882			0.5862	

Leyenda: **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L. **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

4.2. Actividad antibacteriana

4.2.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas mediante el ensayo por microdilución en placa con resazurina se presentan en las Tablas 11-12 y las Figuras 9-10.

Tabla 11. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus*.

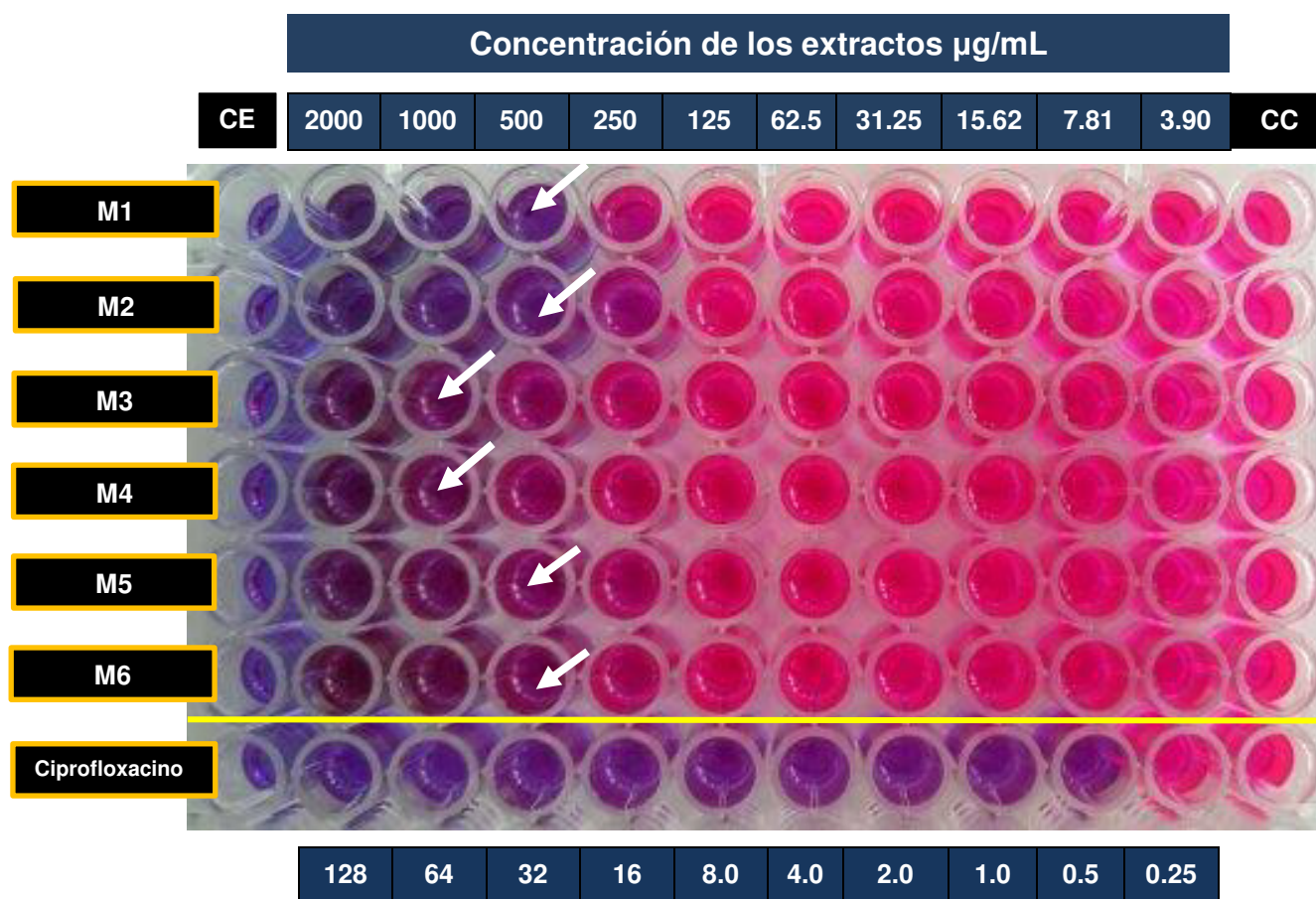
Cepas planctónicas	Concentración Mínima Inhibitoria CMI (µg/mL)					
	Extractos de <i>Hyptis eriocephala</i> Benth				Extractos de <i>Piper umbellatum</i> L.	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 500	≥ 500	≥ 1000	≥ 1000	≥ 500	≥ 500
Control: Ciprofloxacino	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5

Leyenda: Se reportó el CMIB como el promedio de 3 ensayos. **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L. **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

Tabla 12. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus epidermidis*.

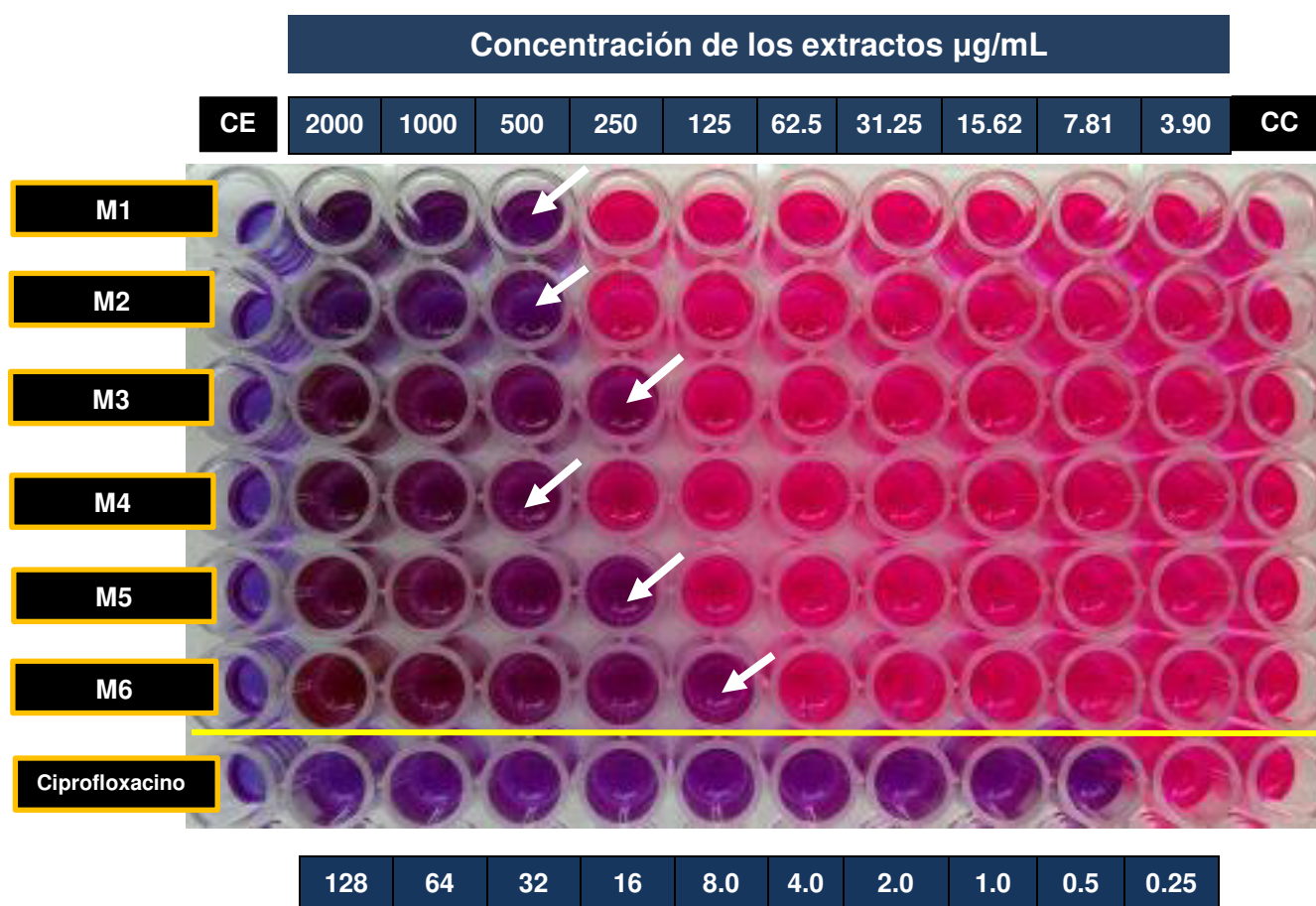
Cepas planctónicas	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) µg/mL					
	Extractos de <i>Hyptis eriocephala</i> Benth				Extractos de <i>Piper umbellatum</i> L.	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	≥ 250	≥ 125
Control: Ciprofloxacino	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5

Leyenda: Se reportó el CMIB como el promedio de 3 ensayos. **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L. **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.



Leyenda: **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L., **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

Figura 9. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus*.



Leyenda: **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L., **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

Figura 10. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas planctónicas de *Staphylococcus epidermidis*.

4.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB)

Los resultados de la determinación de la concentración mínima Inhibitoria de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas mediante el ensayo por microdilución en placa con resazurina se presentan en las Tablas 13-14 y las Figuras 11-12.

Tabla 13. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus aureus*.

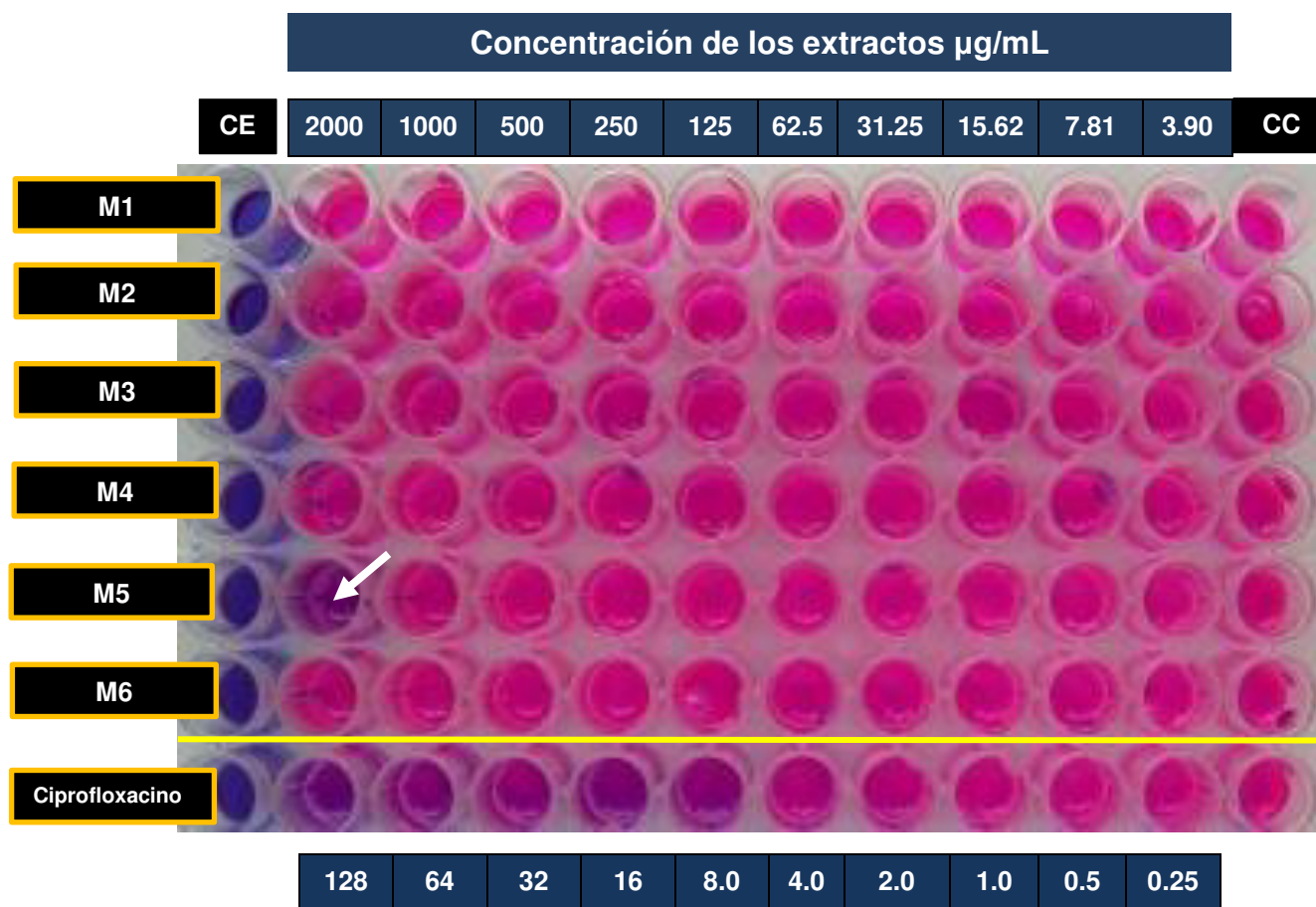
Cepas formadoras de biopelículas	Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) µg/mL					
	Extractos de <i>Hyptis eriocephala</i> Benth				Extractos de <i>Piper umbellatum</i> L.	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	≥ 2000	> 2000
Control: Ciprofloxacino	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0

Leyenda: Se reportó el CMIB como el promedio de 3 ensayos. **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L. **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

Tabla 14. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*.

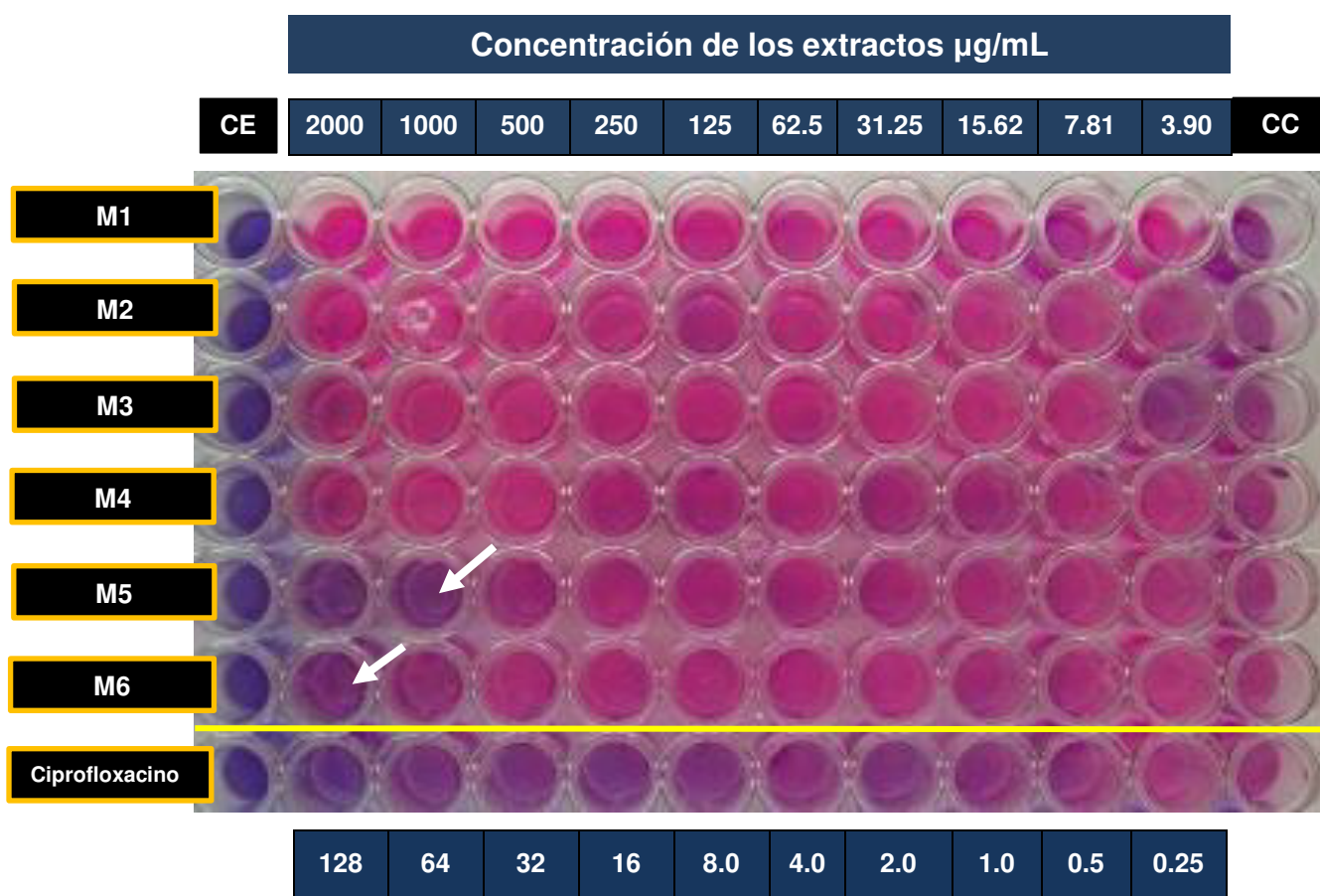
Cepas formadoras de biopelículas	Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) µg/mL					
	Extractos de <i>Hyptis eriocephala</i> Benth				Extractos de <i>Piper umbellatum</i> L.	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	1000	≥ 2000
Control: Ciprofloxacino	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0	≥ 8.0

Leyenda: Se reportó el CMIB como el promedio de 3 ensayos. **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth. **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth. **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L. **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.



Leyenda: **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L., **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

Figura 11. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus aureus*.



Leyenda: **M1:** Extracto etanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M2:** Extracto metanólico de hojas de *Hyptis eriocephala* Benth, **M3:** Extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M4:** Extracto metanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, **M5:** Extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L., **M6:** Extracto metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

Figura 12. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*.

V. DISCUSIÓN

En referencia a la actividad inhibitoria que presentó *Hyptis eriocephala* Benth; Se demostró que los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth presentaron actividad inhibitoria frente al crecimiento de cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, lo cual es acorde con estudios relacionados al género *Hyptis* que evidenciaron actividad antibacteriana en algunas cepas gram positivas. Podemos mencionar los resultados encontrados por Comfort y col.⁸⁵ que demostraron actividad inhibitoria del extracto metanólico de las hojas de *Hyptis suaveolens* frente a *Staphylococcus aureus*. Estudios de la actividad antibacteriana de *Hyptis suaveolens* mencionan que los extractos etanólicos y metanólicos presentaron mayor actividad antibacteriana que los extractos acuosos frente a *Staphylococcus aureus*^{86, 87}. Nuestro estudio utilizó las hojas y tallos de *Hyptis eriocephala* Benth, sin embargo, Ahmad y col⁸⁸ evidenciaron que el extracto metanólico de la raíz de *Hyptis suaveolens* tuvo actividad inhibitoria del crecimiento sobre cepas de *Staphylococcus epidermidis*. Es importante mencionar que *Hyptis martiusii* Benth demostró actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes⁸⁹. Cabe mencionar que la literatura científica no cuenta con estudios específicos de *Hyptis eriocephala* Benth relacionados con la actividad antibacteriana, por lo cual los datos para la comparación de resultados son las investigaciones de las especies más estudiadas del género *Hyptis*.

El extracto etanólico de las hojas de *Hyptis eriocephala* Benth presentó actividad antibacteriana con una CMI de 500 µg/mL frente a las cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus*, mientras que los extractos de los tallos y el extracto

metanólico de las hojas mostraron una CMI a 1000 µg/mL; ambos valores se interpretaron con actividad inhibitoria de acuerdo a Holetz y col ⁸⁴.

Las cepas planctónicas de *Staphylococcus epidermidis* fueron susceptibles al extracto etanólico de las hojas de *Hyptis eriocephala* Benth con un valor de CMI 250 µg/mL, y para el caso del extracto metanólico de las hojas de *Hyptis eriocephala* Benth se evidenció una actividad inhibitoria con un valor de CMI de 500 µg/mL. Con lo cual quedó demostrado que los extractos de las hojas de *Hyptis eriocephala* Benth tuvieron una actividad antibacteriana de débil a moderada frente a las cepas planctónicas *Staphylococcus epidermidis*.

Para los casos en los que se ensayaron los extractos etanólico y metanólico de hojas y tallos de *Hyptis eriocephala* Benth no se demostró actividad anti biopelícula para ambas especies bacterianas.

En referencia a la actividad inhibitoria que presentó *Piper umbellatum* L.; Se demostró que los extractos etanólico y metanólico de las hojas de *Piper umbellatum* L, frente a las cepas planctónicas *Staphylococcus epidermidis*, tuvieron actividad antibacteriana moderada con un valor de CMI de 250 µg/mL. Sin embargo, cuando el extracto etanólico de *Piper umbellatum* L. se enfrentó a las cepas planctónicas de *Staphylococcus aureus* se mostró una actividad antibacteriana débil con un valor de CMI de 1000 µg/mL. Con lo cual, se pudo demostrar que los extractos ensayados de *Piper umbellatum* L, tienen actividad antibacteriana de moderada a débil frente a las cepas planctónicas *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

La actividad antibiopelícula de *Piper umbellatum* L se demostró solo frente a biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* y específicamente con los extractos

etanólicos, con una actividad antibacteriana débil con un valor de CMIB de 1000 µg/mL, los extractos metanólicos no presentaron actividad de inhibición del crecimiento de biopelículas de ninguna de las dos cepas de biopelículas puesto que su valor de CMIB fue mayor de 2000 µg/mL. Cabe considerar que el Control de esterilidad, el control positivo y el control de crecimiento se mantuvieron conformes a lo diseñado en el experimento.

Se empleó el Ciprofloxacino por ser una quinolona que mostró actividad sobre cepas de biopelículas, cabe remarcar que las concentraciones empleadas en el experimento están basadas en las concentraciones séricas descritas por la FDA y lo recomendado por el CLSI/NCCLS Standards ⁹⁰. Se observó que nuestro control positivo de Ciprofloxacino tuvo un comportamiento esperado sobre la inhibición del crecimiento de cepas planctónicas y cepas formadoras de biopelículas con un valor promedio de CMI a ≥ 0.5 µg/mL con lo cual se pudo demostrar su alta actividad sobre las cepas empleadas en el experimento ⁹¹. De Oliveira A. el at empleó el método de microdilución en placa de poliestireno y encontró que el *Staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa-negativos (SCN) no presentaron susceptibilidad antibiopelícula frente a la vancomicina incluso con altas concentraciones de este antibiótico ⁹¹.

El método de microdilución en placa con resazurina permitió evaluar a las cepas formadoras de biopelículas puesto que los métodos tradicionales de laboratorio que evalúan actividad antibacteriana tales como Kirby Bauer solo están orientados a evaluar cepas planctónicas y no para cepas de biopelículas.

El uso de la microplaca permitió el crecimiento de las cepas de biopelículas adheridas a las paredes internas de cada pocillo. Cabe mencionar que previo al

ensayo en la microplaca, se realizó la comprobación de las cepas formadoras de biopelículas mediante el método Agar Rojo de Congo el cual está descrito por la bibliografía como el método más idóneo para el screening preliminar de estafilococos ^{64, 65}.

La actividad antibacteriana que se evidenció por algunos de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y de *Piper umbellatum* L. podrían explicarse por los hallazgos reportados por la Marcha fitoquímica y corroborados con la Cromatografía en capa fina, encontrándose metabolitos secundarios comunes en las dos especies vegetales tales como: Alcaloides, Lactonas, taninos y fenoles.

Cabe mencionar que *Hyptis eriocephala* Benth evidenció una mayor presencia de metabolitos como alcaloides, flavonoides, Lactonas, taninos, fenoles y Triterpenos. Tal es así que los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth mostraron una actividad antibacteriana de moderada a débil frente a cepas planctónicas y una actividad débil frente a cepas formadoras de biopelículas de *Staphylococcus aureus*. Cabe mencionar que *Piper umbellatum* L. está más ampliamente estudiado mediante el uso de los aceites esenciales y en menor medida de sus extractos alcohólicos, siendo los aceites esenciales de *Piper umbellatum* L. reportados con actividad antibacteriana en estudios previos al género *Piper* ^{36,92-95}.

El crecimiento de biopelículas en estos ensayos por microplaca depende de varios factores, como la capacidad de adhesión que tiene la cepa bacteriana sobre la superficie inerte, el pretratamiento de las cepas, los medios de cultivos, el tiempo de crecimiento, ente otros. Específicamente en los casos de

Staphylococcus aureus y *Staphylococcus epidermidis* la literatura reporta que el *Staphylococcus epidermidis* está más vinculado a la capacidad de formar biopelículas sobre superficies inertes como por ejemplo sobre los dispositivos médicos, lo cual podría explicar su mayor crecimiento en las microplacas (mayor biomasa adherida a las paredes internas de los pocillos de poliestireno) y mostrar menor inhibición frente a los extractos ensayados en comparación a los resultados mostrados por *Staphylococcus aureus* ⁹⁶.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de tallos de *Hyptis eriocephala* Benth tiene actividad antibacteriana moderada frente a cepas plantónicas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con un valor de CMI de 250 µg/mL. Los extractos etanólico y metanólico de hojas de *Piper umbellatum* L. tienen actividad antibacteriana moderada frente a cepas plantónicas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con valores de CMI de 250 µg/mL y 125 µg/mL correspondientemente. Todos los demás extractos tienen actividad antibacteriana débil con valores de CMI de 1000 µg/mL y 500 µg/mL.
2. El extracto etanólico de hojas de *Piper umbellatum* L. tiene actividad antibiopelícula débil únicamente frente a biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con un valor de CMIB de 1000 µg/mL. Los demás extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. no tienen actividad antibiopelícula frente a los microorganismos estudiados.

VII. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se recomienda ampliar la batería de solventes para extraer metabolitos con otras polaridades, principalmente para el caso de *Hyptis eriocephala* Benth.

La bibliografía es amplia en referencia a la actividad antimicrobiana que presentan los aceites esenciales de estas dos especies vegetales, es por ello que se recomienda el uso de los aceites esenciales para posteriores estudios de actividad sobre biopelículas de estas especies vegetales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castrillón L, Palma A, Padillas M. Importancia de las biopelículas en la práctica Médica. *Dermatol Rev Mex*. 2010; 54(1): 14-24.
2. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Asif M, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018; 81: 7-11.
3. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, . Donelli G, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21: 1–25.
4. Costerton JW. *The biofilm Primer*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007.
5. Vuong C, Kocianova S, Yao Y, Carmody A, Otto M. Increased Colonization of indwelling Medical Devices by Quorum-Sensing Mutans of *Staphylococcus epidermididis* in vivo. *J Infect Dis*. 2004; 190(8):1498-505.
6. Yang L, Liu Y, Wu H, Song Z, Høiby N, Molin S, et al. Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 65(2): 146-57.
7. Szomolay B, Cogan NG. Modelling mechanical and chemical treatment of biofilms with two phenotypic resistance mechanisms. *Environ Microbiol*. 2015; 17(6): 1870-83.
8. Forte LM, Rebagliati JE. Biopelícula. Una nueva forma de resistencia bacteriana y su evolución, Un problema en la industria energética y farmacológica. *SENASA*. 2013; 1(1): 12-22.
9. Ruiz J, Roque M, Salazar M, Gamarra G, Arias G, Whu D, et al. Actividad antiestafilocócica y antibiopelícula de los extractos de *Juglans neotropica* DIELS, *Piper lineatum* RUIZ&PAV. y *Terminalia catappa* L. *Ciencia e Investigación*. 2013; 16 (1): 32-7

10. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of Bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35: 322-32.
11. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*. 2013 May;(136):1-51.
12. Nazar J. Biofilms bacterianos. *Rev Otorrinolaringol*. 2007; 67(1): 61-72.
13. *Hyptis eriocephala* Benth [Internet]. Diversification, Evolution, and Historical Biogeography of Lamiaceae.. [Citado el 09 Jul 2018]. Disponible en: <http://lamiaceae.myspecies.info/taxonomy-browser/hyptis-eriocephala>
14. Santa Cruz L. Flora de espermatofitas del distrito de Pulán, Santa Cruz-Cajamarca [Tesis de maestría]. [Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
15. *Hyptis eriocephala* Benth [Internet]. Tropicos®, Missouri Botanical Garden. [Citado el 09 Jul 2017]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Image/100202897>
16. *Hyptis eriocephala* Benth [Internet]. Tropicos®, Missouri Botanical Garden. [Citado el 09 Jul 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/17601974?tab=distribution>
17. *Hyptis eriocephala* [Internet]. Encyclopedia of Life EOL. [Citado el 26 Nov 2017]. Disponible en: <http://eol.org/pages/5370519/overview>
18. García FT. Impacto Antrópico en las Plantas Medicinales Nativas del Departamento de Amazonas, Perú. 2006 – 2007 [Tesis doctoral]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2008.
19. McNeil M, Facey P, Porter R. Essential Oils from *Hyptis* genus – A Review (1909-2009). *Nat Prod Commun*. 2011; 6(11): 1775-96.

20. Azevedo NR, Campos IF, Ferreira HD, Portes TA, Santos SC, Seraphin JC, et al. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*. 2001; 57(5): 733-6.
21. Ríos N, Márquez R, Mendoza X, Rojas L, Velasco J, Díaz T, et al. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis suaveolens* (L) Poit. (Lamiaceae) de los Llanos venezolanos. *Rev Per Biol*. 2015; 22(1): 103-7.
22. Picking D, Delgoda R, Boulogne I, Mitchell S. *Hyptis verticillate* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *J Ethnopharmacol*. 2013; 147(1): 16-41.
23. Cruz S, Véliz R, Gómez A, Álvarez L, Cáceres A, Morales J, et al. Caracterización química de los aceites esenciales y extractos de especies mesoamericanas del género *Piper* como nuevos recursos aromáticos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*. 2008; 18(1): 25-9.
24. *Piper umbellatum* L. [Internet]. Tropicos®, Missouri Botanical Garden. [Citado el 19 May 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/25001142>
25. Instituto Nacional de Salud. *Piper umbellatum* L. [Internet]. Inventario Nacional de Plantas Medicinales. [Citado el 2 Nov 2017]. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/plantas/VerCenci.aspx?id=2371>
26. *Piper umbellatum* [Internet]. Encyclopedia of Life EOL. [Citado el 26 Nov 2017]. Disponible en: <http://eol.org/pages/5477870/overview>
27. Pérez J, Izquierdo I. *Piper umbellatum* [Internet]. Museo Virtual de la Ciencia del CSIC; 2014. [Citado el 26 Nov 2017]. Disponible en: <http://museovirtual.csic.es/salas/guinea/biodiversidad/flora/18.htm>

28. *Piper umbellatum* L. [Internet]. Tropicos®, Missouri Botanical Garden. [Citado el 14 Ago 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Image/100224967>
29. *Piper umbellatum* L. [Internet]. Tropicos®, Missouri Botanical Garden. [Citado el 14 Ago 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Image/100465487>
30. Chan EW, Wong SK, Phytochemistry and pharmacology of three *Piper* species: An update. J Pharmacogn Nat Prod. 2014; 1(9): 534-44.
31. Cruz SM, Cáceres A, Álvarez L, Morales J, Apel MA, Henriques AT, et al. Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and methanol extracts. Rev Bras Farmacogn. 2011; 21(4): 587-593.
32. Dyer L, Palmer A. Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution. New York: Springer US; 2004.
33. Durant-Archibold AA, Santana AI, Gupta MP. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A Review. J Ethnopharmacol. 2018; 217: 63-82.
34. Mgbeahuruike EE, Yrjönen T, Vuorela H, Holm Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. S Afr J Bot. 2017; 112: 54–69.
35. Ejele AE, Duru IA, Ogukwe CE, Iwu IC, Phytochemistry and antimicrobial potential of basic metabolites de *Piper umbellatum*, *Piper Guineense*, *Ocimum Gratissimum* and *Newbouldia Laevis* Extracts. JETEAS. 2012; 3(2): 309-14.
36. Da Silva IF, de Oliveira RG, Mendes I, da Costa T, Donizeti S, de Oliveira DT. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action

- of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. J Ethnopharmacol. 2014; 151(1): 137-43.
37. Martins AP, Salgueiro L, Villa R, Tomi F, Cañigueral S, Casanova J, et al. Essential oils from four Piper species. Phytochemistry. 1998; 49 (7): 2019-23.
 38. Parmar V, Jain S, Bisht K, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry. 1997; 46(4): 597-73.
 39. Tchoumboungang F, Jazet P, Sameza L, Fombotioh N, Wouatsa A, Amvam P, et al. Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L., *Piper guineense* Schum. Et Thonn, *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon. Afr J Biotechnol. 2009; 8(3): 424-31.
 40. Tan LY, Yin WF, Chan KG. *Piper nigrum*, *Piper betle* and *Gnetum gnemon* - Natural Food Sources with Anti-Quorum Sensing Properties. Sensors (Basel). 2013; 13(3): 3975-85.
 41. Olivero JT, Pájaro NP, Stashenko E. Antiquorum-Sensing Activity Of Essential Oils Isolated From Different Species Of The Genus *Piper*. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2011; 18(1): 77-82.
 42. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 167 – 93.
 43. Chua SL, Liu Y, Yam JK, Chen Y, Vejborg RM, Tan BG, et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. Nat Commun. 2014; 5: 4462.
 44. Lembre P, Lorentz C, Di Martino P. The Complex World of Polysaccharides [Internet]: INTECH; 2012. Capítulo 13, Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World; p. 371-92. [Citado el 26 Nov 2017]. Disponible en:

<https://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/exopolysaccharides-of-the-biofilm-matrix-a-complex-biophysical-world>

45. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010; 8: 623-633.
46. Høiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. Pathog Dis. 2014; 70(3): 205-11.
47. Sarduy L, González ML. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. Medcentro. 2016; 20(3): 167-75.
48. Faleiro P. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010. [citado el 29 Nov 2017]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>
49. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Rev Microbiol. 2008; 6(3): 199-210.
50. Wimpenny JW, Colasanti R. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on celular automaton models. FEMS Microbiol Ecol. 1997; 22(1): 1–16.
51. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. Endodontic Topics. 2012; 22: 2–16.
52. Marić S, Vranes J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. Period biol. 2007; 109(2): 1-7.
53. Díaz AJ, Vivas R, Puerta L. Ahumado M, Arevalo L, Cabrales R, et al. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. Avances en Periodoncia. 2011; 23(3): 195-201.

54. Costerton JW, Lewandowski Z. The biofilm lifestyle. *Adv Dent Res*. 1997; 11(2): 192-5.
55. Zambrano MA, Londoño LS. Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. *Universitas Odontológica*. 2006; 25(57):19-25.
56. Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull*. 2011; 36(5): 347-55.
57. Philips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms made easy. *Int Wound J*. 2010; 1(3): 1-6.
58. Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015; 80(1): 7-12.
59. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol*. 2001; 183 (9): 2888–96
60. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 207–228.
61. Periasamy S, Jo HS, Duong AC, Bach TH, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(4): 1281–86.
62. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19: 107–12.
63. León SD, Rosas AR, Salazar ME. Penetración in vitro de vancomicina en biopelículas de estafilococos coagulasa negativos aislados de un Hospital de Lima-Perú. *Ciencia e Investigación*. 2016; 19(2): 84-88

64. López LA, del Río Caballero CG, Veloz RE, Alejo GB, Figueredo IC, Duret Y. Detección de biofilm en estafilococo coagulasa negativa y su relación con variables clínicas epidemiológicas. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2016; 20(4): 351-58.
65. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989; 42(8): 872–74.
66. Mariana N, Salman S, Neela V, Zamberi S. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Afr J Microbiol Res*. 2009; 3(6):330-338.
67. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*. 2013; 25(1): 31-42.
68. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007; 115(8): 891-9.
69. Azeredo J, Azevedo N, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Rita A, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 2017; 43(3): 313-51.
70. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007; 42(4):321-4.
71. Antunes AL, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CC, Perez LR, Macedo AJ, et al. Application of a feasible method for determination of biofilm

- antimicrobial susceptibility in staphylococci. APMIS. 2010; 118(11): 873-7.
72. Escobar LM, Rivera A, Aristizábal FA. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2010; 17(1): 67-74.
73. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Cell Viability Assays; p. 262-91. [Citado el 14 Ago 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
74. Shukla SK, Rao TS. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. bioRxivorg. 2017.
75. Welch K, Cai Y, Strømme M. A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. J Funct Biomater. 2012; 3: 418-31.
76. Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA; 2015.
77. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Colombia. 2000.
78. Nostro A, Germano MP, D'angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000; 30(5): 379-84.
79. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 2016.

80. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007; 42(4): 325-9.
81. Quave CL, Plano L, Pantuso T, Bennett B. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2008; 118 (3): 418-28.
82. Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J Microbiol Methods*. 2014; 98: 31-4.
83. Tsouh PV, Kissi A, Yeboah D, Appiah R, Addo P, Tchokouaha L, et al. In vitro activity of selected West African medicinal plants against *Mycobacterium ulcerans* disease. *Molecules*. 2016; 21(4).
84. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7): 1027-31.
85. Comfort O, Johnson G. Antimicrobial Potential of Extracts of *Hyptis suaveolens* (L) Poit. Leaves on Some Gram Positive Bacterial Isolates. *JAMPS*. 2017; 12(4): 2394-1111.
86. Mozhiyarasi P., Anuradha R. A study on phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit. *J Chem Pharm Res*. 2016; 8(6): 438-42.
87. Pachkore GL, Dhale DA, Dharasurkar AN. Antimicrobial and phytochemical screening of *Hyptis suaveolens* (L.Poit) Lamiaceae. *Int Multidiscip Res J*. 2011; 1(4): 1-3.

88. Ahmad J, Iffat K, Ahmad A, Imam K. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Methanolic root Extracts of *Hyptis suaveolens*. Res J Recent Sci. 2013; 2: 41-46.
89. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA strains. Rev Bras Pharmacogn. 2008; 18: 670-5.
90. Florián C, Alvarado D, Cocha J. Evaluación in vitro de la resistencia a ciprofloxacina en biopelículas y poblaciones planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario. An Fac Med Lima. 2006; 67(4): 290-97.
91. De Oliveira A, Pereira V, Pinheiro L, Moraes DF, Benini K, Ribeiro de Souza L. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. Int J Mol Sci. 2016; 17(9): 1–12.
92. Gómez AL. Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de *Piperaceas* (*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*) [Tesis pre grado]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2008. [citado el 29/11/2017]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2716.pdf
93. Pino N, Meléndez EM, Stashenko EE. Essential Oil Composition from Two Species of *Piperaceae* Family Grown in Colombia. J Chromatogr Sci. 2009; 47(9): 804-7.
94. Obinna N, Nwodo C, Olayinka A, Chinwe I, Kehinde O. Antibacterial effects of extracts of *Ocimum gratissimum* and *piper guineense* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Afr J Food Sci. 2009; 3(3): 77-81.

95. Ejele AE, Duru IA, Oze RN, Iwu IC, Ojukwe CE. Comparison of antimicrobial potential of *Piper umbellatum*, *Piper guineense*, *Ocimum gratissimum* and *Newbouldia laevis* extracts. IRJBB. 2012; 2(2): 35-40.
96. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000; 54: 49-79.

IX. ANEXOS

ANEXO N° 1

José Ricardo Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 017512863 RPM #963689079
E-mail: jocamde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, CHÁVEZ MONTERROSO, JOSÉ FELICIANO y BRICEÑO LEÓN, RICARDO JHOEL, Bachilleres, egresados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; con fines de investigación para desarrollar la tesis titulada "Determinación del efecto de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. sobre las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*", han solicitado la identificación y certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de "poleo blanco", la muestra ha sido identificada como *Hyptis eriocephala* Benth. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnolopsida
SUBCLASE	: Asteridae
ORDEN	: Lamiales
FAMILIA	: Lamiaceae
GENERO	: <i>Hyptis</i>
ESPECIE	: <i>Hyptis eriocephala</i> Benth.

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 25 de julio del 2017


José R. Campos de la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. SÁNCHEZ SILVA N° 156 – PISO 02 – URBANIZACIÓN SANTA LUZMILA- LIMA 07

ANEXO N° 2

José Ricardo Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 017512863 RPM #963689079
E-mail: jcamde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, CHÁVEZ MONTERROSO, JOSÉ FELICIANO y BRICEÑO LEÓN, RICARDO JHOEL, Bachilleres, egresados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; con fines de investigación para desarrollar la tesis titulada "Determinación del efecto de los extractos de *Hyptis eriocephala* Benth y *Piper umbellatum* L. sobre las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*", han solicitado la identificación y certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de "santa maría", la muestra ha sido identificada como *Piper umbellatum* L. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnolopsida
SUBCLASE	: Magnoliidae
ORDEN	: Piperales
FAMILIA	: Piperaceae
GENERO	: <i>Piper</i>
ESPECIE	: <i>Piper umbellatum</i> L.

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 25 de julio del 2017


José R. Campos de la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. SÁNCHEZ SILVA N° 156 – PISO 02 – URBANIZACIÓN SANTA LUZMILA- LIMA 07

ANEXO N° 3

2/11/2017

Plantas Medicinales



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

Centro Nacional Salud
Intercultural

Consulta del Inventario Nacional de Plantas Medicinales

Nombre Científico: *Piper umbellatum* L.

Nombre Familia: Piperaceae

Nombre Comun: Santa maría.

**Otros Nombre
Comunes:** Corarnopan, o'mueretspan popnor (v. Yanesha).

Origen: Nativa.

Altitud: 0-2500 m.

Distrib. Geográfica: Amazonas, Cuzco, Huanuco, Junin, Loreto, Pasco, San Martin, Ucayali

Foto: ND

**Usos en Medicina
Tradicional:** Usos yanesha: chupos (forúnculos); heridas; picadura de raya.

**Otros usos
tradicionales:** ND

Etimología: Para los Yanesha, corar es una especie de sapito pequeño, de color blanco, comestible; o'muerets significa sangre infectada después del parto.

**Referencia
Bibliografía:** 1. Brako L, Zarucchi JL. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri Botanical Garden; 1993. t. I y t. II.
2. Missouri Botanical Garden (MBG) [Página Web en Internet] Trópicos® [Base de Datos en Internet] Saint Louis (MO): MBG; 2009. Disponible en: <http://www.tropicos.org/>.
3. Bourdy G, Valadeau C, Albán J, editores. Yato' Ramuesh: Plantas Medicinales Yanesha.: Lima: Remanso Ediciones E.I.R.L.; 2008.

Imprimir

ANEXO N° 4

MATERIALES Y EQUIPOS

Medios de cultivo

- Agar Triptona de Soya (Merck).
- Caldo Mueller Hinton (Merck).

Reactivos

- Agua destilada (B Braun Medical)
- Etanol 96% (Merck)
- Metanol (Merck)
- Solución Salina Estéril 0.9% (B Braun Medical)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Resazurina (Sigma Aldrich, USA)
- Dimetilsulfóxido DMSO (Merck)

Estándar secundario

- Ciprofloxacino 94.05%

Equipos

- Autoclave (FAVRILL)
- Molino de cuchillas N° 21
- Molino Industrial
- Rotavapor (BUCHI)
- Estufa eléctrica de 37° C (MEMMERT)
- Horno de esterilización (MEMMERT)
- Balanza digital (Denver Instrument Modelo XP-300)
- Balanza analítica (Sartorius Modelo CPA 2245)

Otros materiales

- Micropipeta Multicanal de 10 – 100 µL (EPPENDORF Research)
- Micropipeta Transferpette de 10 – 100 µL (BOECO Germany)
- Micropipeta Transferpette de 100 – 1000 µL (PIPET 4LL)
- Microplaca de poliestireno estériles (Thermo Scientific)
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10mL (ISOLAB)
- Placas Petri descartables (ISOLAB)
- Placas Petri estériles de vidrio 15 x 100 mm (PIREX)
- Asa Drigalsky estéril
- Asas de siembra de Kohle

ANEXO N° 5



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA



CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA
PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º 00448-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 04672/2017
SOLICITADO POR	: RICARDO JHOEL BRICEÑO LEÓN JOSÉ FELICIANO CHAVEZ MONTERROSO
MUESTRA	: MI
NÚMERO DE LOTE	: ----
CANTIDAD	: 10 mL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 06 de Octubre del 2017
FECHA DE FABRICACIÓN	: ----
FECHA DE VENCIMIENTO	: ----

MARCHA FITOQUÍMICA			
METABOLITO	ENSAYO	RESULTADOS	
ANTOCIANINAS	Reacción de ácido sulfúrico	-	-
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	++	+++
LACTONAS	Reacción de Baljet	++	+++
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	+	+
CARDENÓLIDOS	Reacción de Kedde	-	-
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	-	-
TANINOS	Reacción con cloruro férrico	+++	+++
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	-	-
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	+++	+++
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann – Burchard	+	+

Leyenda:
+++ : Reacción muy evidente
++ : Reacción evidente
+ : Reacción poco evidente
- : No hubo reacción

Lima, 11 de Octubre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification



ANEXO N° 6



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA



CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA
PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00449-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 04672/2017
SOLICITADO POR	: RICARDO JHOEL BRICEÑO LEÓN JOSÉ FELICIANO CHAVEZ MONTERROSO
MUESTRA	: M2
NÚMERO DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 10 mL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 06 de Octubre del 2017
FECHA DE FABRICACIÓN	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

MARCHA FITOQUÍMICA			
METABOLITO	ENSAYO	RESULTADOS	
ANTOCIANINAS	Reacción de ácido sulfúrico	-	-
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	++	++
LACTONAS	Reacción de Baljet	+	+
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	+	+
CARDENÓLIDOS	Reacción de Kedde	-	-
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	-	-
TANINOS	Reacción con cloruro férrico	+	+
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	-	-
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	-	-

Leyenda:

+++ : Reacción muy evidente
++ : Reacción evidente
+ : Reacción poco evidente
- : No hubo reacción

Lima, 11 de Octubre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification

Nº 00223010



ANEXO N° 7



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00450-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 04672/2017
SOLICITADO POR	: RICARDO JOHEL BRICEÑO LEÓN JOSÉ FELICIANO CHAVEZ MONTERROSO
MUESTRA	: M3
NÚMERO DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 10 mL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 06 de Octubre del 2017
FECHA DE FABRICACIÓN	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

MARCHA FITOQUÍMICA			
METABOLITO	ENSAYO	RESULTADOS	
ANTOCIANINAS	Reacción de ácido sulfúrico	-	-
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	++	++
LACTONAS	Reacción de Baljet	+	+
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	+	+
CARDENÓLIDOS	Reacción de Kedde	-	-
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	-	-
TANINOS	Reacción con cloruro férrico	++	++
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	+	-
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	+	+

Leyenda:

+++ : Reacción muy evidente
++ : Reacción evidente
+ : Reacción poco evidente
- : No hubo reacción

Lima, 11 de Octubre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification



ANEXO N° 8



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA



CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA **PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00451-CPF-2017**

ORDEN DE ANÁLISIS	: 04672/2017
SOLICITADO POR	: RICARDO JHOEL BRICEÑO LEÓN JOSÉ FELICIANO CHAVEZ MONTERROSO
MUESTRA	: M4
NÚMERO DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 10 mL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 06 de Octubre del 2017
FECHA DE FABRICACIÓN	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

MARCHA FITOQUÍMICA		
METABOLITO	ENSAYO	RESULTADO
ANTOCIANINAS	Reacción de ácido sulfúrico	-
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	++
LACTONAS	Reacción de Baljet	+
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	+
CARDENÓLIDOS	Reacción de Kedde	-
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann – Burchard	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	-
TANINOS	Reacción con cloruro férrico	+
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann – Burchard	-
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	-
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	+

Leyenda:

+++ : Reacción muy evidente
++ : Reacción evidente
+ : Reacción poco evidente
- : No hubo reacción

Lima, 11 de Octubre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANEXO N° 9



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA



CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA
PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00452-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 04672/2017
SOLICITADO POR	: RICARDO JOEL BRICEÑO LEÓN JOSÉ FELICIANO CHAVEZ MONTERROSO
MUESTRA	: M5
NÚMERO DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 10 mL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 06 de Octubre del 2017
FECHA DE FABRICACIÓN	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

MARCHA FITOQUÍMICA			
METABOLITO	ENSAYO	RESULTADOS	
ANTOCIANINAS	Reacción de ácido sulfúrico	-	-
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	++	++
LACTONAS	Reacción de Baljet	+	++
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	-	+
CARDENÓLIDOS	Reacción de Kedde	-	-
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	-	-
TANINOS	Reacción con cloruro férrico	-	++
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	+	-
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	-	+

Leyenda:

+++ : Reacción muy evidente
++ : Reacción evidente
+ : Reacción poco evidente
- : No hubo reacción

Lima, 11 de Octubre del 2017

[Firma]

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANEXO N° 10



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00453-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 04672/2017
SOLICITADO POR	: RICARDO JHOEL BRICEÑO LEÓN JOSÉ FELICIANO CHAVEZ MONTERROSO
MUESTRA	: M6
NÚMERO DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 10 mL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 06 de Octubre del 2017
FECHA DE FABRICACIÓN	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

MARCHA FITOQUÍMICA			
METABOLITO	ENSAYO	RESULTADOS	
ANTOCIANINAS	Reacción de ácido sulfúrico	-	-
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	++	++
LACTONAS	Reacción de Baljet	-	-
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	+	-
CARDENÓLIDOS	Reacción de Kedde	-	-
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann – Burchard	-	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	-	-
TANINOS	Reacción con cloruro férrico	+	-
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann – Burchard	+	-
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	+	-
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	+	-

Leyenda:

+++ : Reacción muy evidente
++ : Reacción evidente
+ : Reacción poco evidente
- : No hubo reacción

Lima, 11 de Octubre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANEXO N° 11

